Synthese der kupplungsfähigen Teilsequenzen zur Totalsynthese des Secretins

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Walter Göhring
aus Zillhausen

1974

74 457

Synthese der kupplungsfähigen Teilsequenzen zur Totalsynthese des Secretins

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Walter Göhring
aus Zillhausen

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	9. Oktober 1974
Dekan	Prof. Dr. E. Lindner
1. Berichterstatter	Prof. Dr. G. Jung
2. Berichterstatter	Prof. Dr. E. Bayer

M E I N E N E L T E R N

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546514_0046

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von
Herrn Prof. Dr. Günther Jung
in der Zeit von April 1972 bis August 1974 im Physiologisch-Chemischen Institut und im Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem sehr verehrten Lehrer

HERRN PROF. DR. GÜNTHER JUNG

danke ich herzlich für die Themenstellung, für viele wertvolle Anregungen und für die wohlwollende Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer danke ich für die großzügige Unterstützung und für sein Interesse an meiner Arbeit.

Dem Land Baden-Württemberg danke ich für ein Graduierten-Stipendium.

INHALTSVERZEICHNIS Seite

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG 1

1. Eigenschaften und Struktur des Secretins 1
2. Bisherige synthetische Arbeiten 3

II. ALLGEMEINER TEIL 5

1. Problematik der Peptidsynthese 5
2. Kupplungsmethoden 6
3. Schutzgruppen 10
4. Strategien der Peptidsynthese 11
   4.1. Klassische Synthese 11
   4.2. Träger-Synthesen 12
5. Liquid-Phase-Methode 18
   5.1. Veresterung der C-terminalen Aminosäure mit dem PEG 18
   5.2. Abspaltung der Schutzgruppen 19
   5.3. Kupplungsreaktionen und Umsatzkontrollen 22
   5.4. Abspaltung des Peptids vom PEG 23
      a) Abspaltung durch Ammonolyse 23
      b) Abspaltung durch Hydrazinolyse 24
6. Strategie der Secretinsynthese 24
7. Guanidierung 27
   7.1. Synthese der Ornithin-Tripeptide 29
      a) Boc-L-Orn(Z)-Leu-OMe 29
      b) Guanidierung des Dipeptids 29
      c) Darstellung der Tripeptide 30
8. Synthesen der kupplungsfähigen Secretinfragmente 33
   8.1. Synthese des Fragments I (15-27) 33
   8.2. Synthese des Fragments II (9-14) 38
   8.3. Synthese des Fragments III (3-8) 40

8.4. Synthese des Fragments IV (1-2) 44
a) Adoc-L-His(Adoc)-Ser(Bzl)-OMe 44
b) Adoc-L-His(Adoc)-Ser(Bzl)-N_2H_3 46

III. EXPERIMENTELLER TEIL 50
A. Darstellung der benötigten Aminosäurederivate 50
1. Darstellung von Boc-N_3 50
2. Darstellung von Z-Cl 50
3. Darstellung von Adoc-Cl 51
4. Darstellung der Boc-L-Aminosäuren 51
4.1. Boc-L-Gln-ONp 54
4.2. Boc-Gly-ONp 55
4.3. H-L-Orn(Z)-OH 55
4.4. Boc-L-Orn(Z)-OH·DCHA 56
4.5. Boc-L-Ser(Bzl)-OH 57
4.6. Boc-L-Thr(Bzl)-OH 61
4.7. Boc-L-Asp(OtBu)-OH 63
4.8. Boc-L-Glu(OtBu)-OH 68
4.9. Adoc-L-His(Adoc)-OH 73
5. Darstellung der Aminosäureester 74
5.1. H-L-Leu-OMe·HCl 74
5.2. H-L-Ser(Bzl)-OEt·HCl 75
5.3. H-L-Ser(Bzl)-OMe·HCl 75
B. Darstellung der Ornithin-Tripeptide 76
1. Boc-L-Orn(Z)-Leu-OMe 76
2. Boc-L-Orn(Z)-Leu-NH_2 77
3. Boc-L-Orn-Leu-NH_2 78
4. Boc-L-Gln-Orn(Z)-Leu-OMe 78
5. Boc-L-Ala-Orn(Z)-Leu-OMe 79
6. Boc-L-Ser-Orn(Z)-Leu-OMe 80
C. Liquid-Phase-Synthese der Sequenz 15-27 81
1. Veresterung des Boc-L-Valin mit PEG 81
2. Abspaltung der Boc-Schutzgruppe 83
3. Kupplung der Boc-Aminosäuren 83
4. Abspaltung des Peptids vom Träger durch Ammonolyse 92

D. Synthese der Sequenz 9-14 am PEG 93
1. Veresterung des Boc-L-Orn(Z)-OH mit dem PEG 93
2. Kupplung der Aminosäurederivate 93
3. Abspaltung des Peptids vom PEG durch Hydrazinolyse 96
E. Synthese der Sequenz 3-8 am PEG 98
1. Veresterung des Boc-L-Ser(Bzl)-OH mit PEG 98
2. Kupplung der Aminosäurederivate 98
3. Abspaltung des Peptids vom Träger 101
F. Synthese des Dipeptids der Secretinsequenz 1-2 104
1. Adoc-L-His(Adoc)-Ser(Bzl)-OEt 104
2. Adoc-L-His(Adoc)-Ser(Bzl)-OMe 105
3. Adoc-L-His(Adoc)-Ser(Bzl)-N_2H_3 106

IV. ZUSAMMENFASSUNG 107

V. LITERATURVERZEICHNIS 108

Folgende Abkürzungen werden verwendet:

Adoc	Adamantyloxycarbonyl-
Boc	t.-Butyloxycarbonyl-
Bzl	Benzyl-
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
EtOH	Äthanol
HAc	Essigsäure
MeOH	Methanol
OEt	Äthylester
OMe	Methylester
ONp	p-Nitrophenylester
PEG	Polyäthylenglykol
Z	Benzyloxycarbonyl-

Die Abkürzungen der Aminosäuren entsprechen den IUPAC-Regeln

I) Einleitung und Problemstellung

1) Eigenschaften und Struktur des Secretins

Die Entdeckung von Hormonwirkungen der Schleimhaut des Verdauungskanals geht auf die Beobachtung zurück, daß durch Aufbringen von Säure auf die Schleimhaut des Duodenums eine Sekretion von Pankreassaft ausgelöst werden kann, und daß man durch Injektion von sauren Extrakten dieser Schleimhaut den gleichen Effekt erzielt. Dagegen sind Extrakte anderer Darmabschnitte und Organe völlig wirkungslos. Die Substanz, auf der diese Wirkung beruht, ist das Secretin.

Secretin ist das erste nachgewiesene, gastrointestinale Hormon. Bayliss und Starling haben seine Wirkung im Jahre 1902 entdeckt (1) und gleichzeitig den Begriff des Hormons geschaffen. Secretin stimuliert den Pankreas zur Sekretion von Wasser und Bicarbonat und hemmt die Magensekretion. Ferner führt es zur Ausschüttung von Insulin. Secretin wird in der Schleimhaut des Duodenums gebildet, durch chemische Reize, im allgemeinen durch Säuren, ausgeschüttet und dann ans Blut abgegeben. Es sorgt durch Anregung der Ausschüttung von bicarbonatreichem Pankreassaft für die Neutralisation des sauren, aus dem Magen kommenden Speisebreis, unter dessen Einwirkung es von der Schleimhaut des Duodenums abgegeben wird. Diese Neutralisation ist notwendig, weil die Enzyme des Pankreas und der Darmschleimhaut in stark saurem Medium wenig wirksam sind. (2) Secretin wirkt in Verbindung mit Pankreozymin, das eine Erhöhung der Enzymkonzentration bewirkt. Aus 1000 Schweinen kann nur etwa 1 mg Secretin isoliert werden, (3) andererseits induziert 1 mg Secretin die Ausschüttung von 40 Litern 0,1 N Bicarbonatlösung.

Secretin ist ein einkettiges Polypeptid, das in reiner Form von Jorpes und Mutt aus den Eingeweiden von Schweinen isoliert wurde (4). Es besteht aus 27 Aminosäuren, deren Sequenz ebenfalls von Jorpes, Mutt und Mitarbeitern aufgeklärt wurde (5) . Seine Biosynthese ist noch ungeklärt. Phylogenetische Studien deuten darauf hin, daß wie bei anderen Peptidhormonen vermutlich ein Prosecretin existiert, aus dem dann Secretin freigesetzt wird. Das Heptacosapeptidamid Secretin hat ein Molekulargewicht von 3056 und infolge seines hohen Anteils basischer Aminosäuren einen relativ hohen isoelektrischen Punkt im pH-Bereich zwischen 10 und 11.

Sequenz des (Schweine) - Secretins:

His -	Ser -	Asp -	Gly -	Thr -	Phe -	Thr -	Ser -	Glu -
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Leu -	Ser -	Arg -	Leu -	Arg -	Asp -	Ser -	Ala -	Arg -
10	11	12	13	14	15	16	17	18
Leu -	Gln -	Arg -	Leu -	Leu -	Gln -	Gly -	Leu -	
19	20	21	22	23	24	25	26	
Val - NH_2								
27								

Während in manchen Peptidhormonen, wie z.B. in Gastrin oder in ACTH bereits Teilsequenzen eine biologische Aktivität zeigen, scheint beim Secretin nur die gesamte Sequenz biologisch aktiv zu sein, zumindest sind bis heute noch keine aktiven Teilsequenzen gefunden worden. Es wurde gezeigt, daß bereits das Fehlen des N-terminalen Histidins (6), oder der Ersatz von Asparaginsäure durch Asparagin in Position 3, oder auch das Fehlen der Säureamidfunktion am C-terminalen Valin (7) einen drastischen Verlust, bzw. einen Gesamtverlust der Aktivität zur Fol-

ge haben. Andererseits wurde durch Ersatz der vier Arginine durch Ornithin ein aktives analoges Secretin erhalten (8).

2) Bisherige synthetische Arbeiten

Zwei klassische Synthesen des Secretins sind M. Bodanszky und Mitarbeitern gelungen. In den ersten Veröffentlichungen 1966 und 1967 (9), (10) beschreibt Bodanszky eine schrittweise Synthese unter ausschließlicher Verwendung der p-Nitrophenylestermethode. Außerdem wurden die Teilsequenzen 14-27, 9-13, 5-8 und 1-4 vom C-terminalen Ende her synthetisiert (11) und diese Bruchstücke anschließend mit Hilfe der Azidmethode gekuppelt (12).

Von E. Wünsch wurde die detaillierte Ausarbeitung einer weiteren Totalsynthese publiziert. Er synthetisierte die Teilsequenzen 18 - 27 (13), 12 - 27 (14), 7 - 11 (15) und 1 - 6 (16) und kuppelte diese zur Gesamtsequenz (17,18)

Smithers konnte zeigen, daß das von ihm synthetisierte Orn^{12}, Orn^{14}, Orn^{18}, Orn^{21} - Secretin (8) eine ähnliche biologische Aktivität aufweist wie das natürliche Peptid.

G. Jäger, W. König und R. Geiger synthetisierten das Secretin ebenfalls durch Fragmentkondensation mit Dicyclohexylcarbodiimid als Kondensationsmittel unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol bzw. 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin (20). Dabei wurde ein Teil der von Wünsch ausgearbeiteten Methoden übernommen.

Eine Festkörpersynthese des C-terminalen Hexapeptidamids von Secretin wurde 1971 von E. Bayer und Mitarbeitern durchgeführt. Dabei wurde erstmals die Abspaltung vom Harz in Dimethylformamid und flüssigem Ammo-

niak im Verhältnis 1:1 in einer Ampulle durchgeführt, (19) die mit verhältnismäßig guten Ausbeuten direkt zum betreffenden Amid führt, obwohl das C-terminale Valin aus sterischen Gründen nur schwer in das Amid überführt werden kann. Diese Aminolysemethode läßt sich auch noch zur Abspaltung längerer C-terminaler Fragmente einsetzen (21).

A. van Zon und H. C. Beyermann synthetisierten das C-terminale Hexadecapeptid mit Hilfe der von ihnen entwickelten REMA-Methode (Repetitive Excess Mixed Anhydrid-Methode) (22).

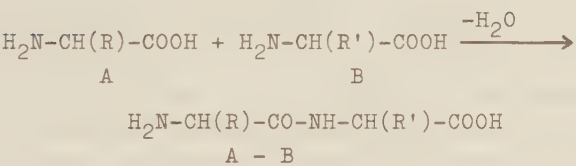
Eine weitere Merrifieldsynthese des C-terminalen Hexapeptids, bzw. des C-terminalen Octapeptids des Secretins führte B. Hemmasi durch (23). Er legte dabei besonderen Wert auf die etwas problematische DCCI-Kupplung von Glutamin.

Keiner der bisher eingeschlagenen Synthesewege stellt einen bequemen Zugang zu dem wichtigen Peptidhormon dar. In der vorliegenden Arbeit sollte daher versucht werden, durch geeignete Kombination von klassischer Synthese mit der Synthese am polymeren Träger über Fragmentkondensationen ein ornithinanaloges Secretin zu synthetisieren, das durch Guanidierung in natürliches Secretin überführt werden kann. Dadurch könnte, wie später erläutert wird, insbesondere die Problematik des Schutzes der Seitenfunktionen wesentlich vereinfacht werden.

II) Allgemeiner Teil

1) Problematik der Peptidsynthese

Die charakteristische Reaktion bei der Peptidsynthese ist die Ausbildung der Peptidbindung zwischen der Carboxylgruppe einer Aminosäure A und der Aminogruppe einer anderen Aminosäure B.



Diese Reaktion setzt einerseits eine Aktivierung der Carboxylgruppe von A voraus, damit der Stickstoff der Aminokomponente B mit seinem freien Elektronenpaar am positivierten Carboxyl-Kohlenstoff von A angreifen kann. Andererseits muß gewährleistet sein, daß die Reaktion einheitlich verläuft, d. h. z. B. die Aminofunktion der Aminosäure A und die Carboxylgruppe der Aminosäure B müssen durch geeignete Schutzgruppen blokkiert werden. Andernfalls wäre das Ergebnis der Synthese eine unkontrollierte Polykondensation. Voraussetzung zur Synthese reiner Peptide ist demnach die Blockierung aller funktionellen Gruppen, die nicht an der Reaktion beteiligt sein sollen. Bei der Wahl der Schutzgruppen muß zwischen solchen Gruppen, die nach jedem Kupplungszyklus abgespalten werden, und solchen, die während der gesamten Synthese am Peptid bleiben, unterschieden werden. Erstere werden im allgemeinen zur Blockierung der α-Aminofunktion, letztere zur Blockierung der Drittfunktionen verwendet.

2) Kupplungsmethoden

Von der großen Zahl der Kupplungsmethoden seien hier nur die besonders bewährten angeführt. Eine der ältesten Methoden, die immer noch gerne verwendet wird, ist die von Curtius eingeführte Azidmethode (24). Dabei werden Acylaminosäureester mit Hydrazin in die Hydrazide überführt, die dann mit salpetriger Säure zu den reaktiven Aziden umgesetzt werden. Diese Methode läßt sich gut für Fragmentkondensationen verwenden. Außerdem hat es sich gezeigt, daß die Azidkupplung im allgemeinen fast racemisierungsfrei verläuft (25). Die schnelle Reaktion der Hydrazide mit der salpetrigen Säure erlaubt die Anwesenheit ungeschützter Säureamidgruppierungen, oft auch ungeschützter Hydroxyl- und Carboxylseitenketten, ohne daß Nebenreaktionen auftreten. Allerdings können als Nebenprodukte bei der Azidmethode schlecht vom Produkt abtrennbare Harnstoffderivate auftreten (26), (27), (28), die aus den durch Curtiusumlagerung entstandenen Isocyanaten bei der Kupplung mit der Aminokomponente entstehen.

$$Z\text{-NH-CH(R)-CON}_3 \longrightarrow Z\text{-NH-CH(R)-N=C=O} \xrightarrow{H_2N\text{-}R'}$$

$$Z\text{-NH-CH(R)-NH-CO-NH-R'}$$

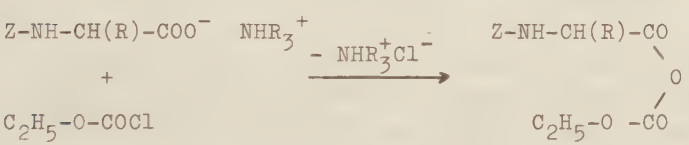
Eine weitere Nebenreaktion bei der Azidmethode haben Honzl und Rudinger entdeckt, es ist dies die Bildung von Amiden aus dem Azid (29) nach folgendem Reaktionsschema:

$$Z\text{-NH-CH(R)-CON}_3 \xrightarrow{H_2O} Z\text{-NH-CH(R)-CONH}_2 + N_2O$$

Wie die o. a. Autoren gefunden haben, läßt sich diese

Nebenreaktion durch niedrige Temperatur vermeiden, wenn ein wasserfreies Medium und Alkylnitrite anstatt aus Natriumnitrit und Salzsäure gewonnene salpetrige Säure verwendet werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Aktivierung der Carboxylgruppe von Aminosäuren ist die Darstellung von symmetrischen oder gemischten Anhydriden. Zur Herstellung gemischter Anhydride werden meist Kohlensäurehalbester und Kohlensäurehalbchloride und geschützte Aminosäuren mit einem Mol einer tertiären Base umgesetzt (30), (31).



Während diese gemischten Anhydride trotz ihrer Reaktivität selten eingesetzt werden, hat sich der Einsatz symmetrischer Anhydride besonders bei der Merrifieldsynthese und bei der Flüssigphasenmethode als vorteilhaft erwiesen. Symmetrische Anhydride wurden von Weygand in die Peptidchemie eingeführt (32). Ihre Darstellung wurde von Wieland und Mitarbeitern verbessert. (33) Bei der Festphasensynthese nach Merrifield störte bisher ausfallender Dicyclohexylharnstoff bei der direkten Kupplung mit Dicyclohexylcarbodiimid die Diffusionsvorgänge am Harz (34). Dies wird bei Verwendung von symmetrischen Anhydriden vermieden. Außerdem läßt sich die Reaktionszeit verkürzen.

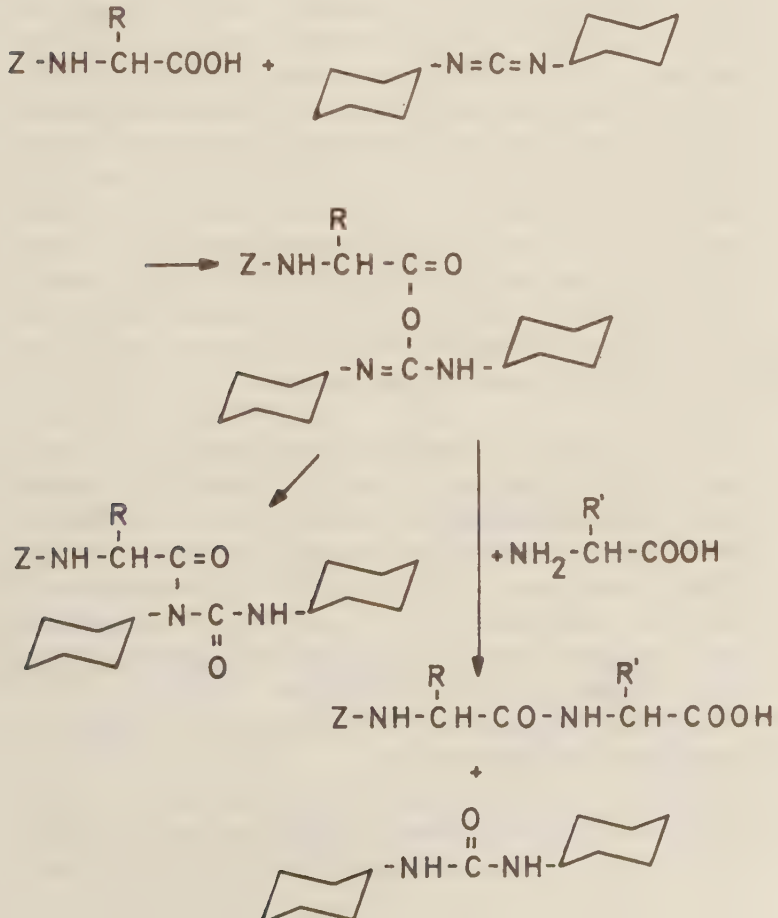
Eine spezielle Variante der gemischten Anhydride sind die N-Carboxyanhydride oder Leuchs'schen Anhydride. Sie wurden erstmals von Leuchs (35), (36) durch thermische Eliminierung von Alkylchloriden aus Alkoxycarbonylaminosäurechloriden dargestellt. Eine etwas einfachere Darstellung ist die Umsetzung der Aminosäuren mit Phosgen(37). Die Kupplung wird bei niederen Temperaturen

und in Gegenwart einer tertiären Base durchgeführt, da unter diesen Bedingungen Carbaminsäurezwischenprodukte genügend stabil sind. Anschließende Erwärmung auf Zimmertemperatur führt zur Dissoziation des Carbaminsäuresalzes und zur Decarboxylierung. Diese Kupplungsmethode hat den Vorteil, daß die Aktivierung der Carboxylgruppe und die Blockierung der Aminofunktion in einem Schritt durchgeführt wird und die anschließende Abspaltung der Schutzgruppe unter mildesten Bedingungen verläuft. Diese Methode wurde besonders von Hirschmann und Denkewalter (38) und neuerdings von Pfaender (39) zur Peptidsynthese eingesetzt.

Eine andere Möglichkeit zur Aktivierung der Carboxylgruppe ist die Bildung aktiver Ester. Von ihnen sind die p-Nitrophenylester (40), die Trichlorphenyl- (41) und die Pentachlorphenylester (42) besonders gebräuchlich. Auch die Hydroxysuccinimidester werden häufig verwendet (43).

Bei weitem am meisten verbreitet ist die Carbodiimid-Kupplung von J.C.Sheehan und G.W.Hess (44), (45). Die hohe Reaktivität der Carbodiimide verringert die Kupplungszeiten oft auf wenige Minuten. Als reaktives Zwischenprodukt entsteht ein O-Acylharnstoffderivat aus Dicyclohexylcarbodiimid und der Carboxylkomponente. Dieses O-Acylharnstoffderivat wird von der Aminkomponente angegriffen und in Dicyclohexylharnstoff und Peptid gespalten (46) (47). Eine Nebenreaktion ist die mögliche Umlagerung des reaktiven O-Acylharnstoffderivats in das stabile, nicht mehr acylierende N-Acylharnstoffderivat. Der bei der Reaktion entstehende Dicyclohexylharnstoff ist unlöslich in Wasser und in fast allen organischen Lösungsmitteln außer Alkoholen, Eisessig und Essigester. Letzte Reste des Harnstoffs können deshalb meist durch Umkristallisation des Peptids aus Äthanol entfernt werden. Da dies manchmal nicht möglich

ist, wurden neue Carbodiimide wie z. B. N-Äthyl, N'-(γ-dimethylaminopropyl)-carbodiimid hergestellt, die wasserlösliche Harnstoffderivate ergeben und leichter aus den geschützten Peptiden auswaschbar sind. Da bei Carbodiimidkupplungen gelegentlich Racemisierungen beobachtet worden sind, haben E. Wünsch durch molaren Zusatz von N-Hydroxysuccinimid (48) und König und Geiger durch molaren Zusatz von N-Hydroxybenzotriazol (49) aus dem primär gebildeten O-Acylharnstoff die N-Hydroxysuccinimidester bzw. N-Hydroxybenzotriazolester hergestellt, die äußerst reaktiv sind und racemisierungsfrei mit der Aminkomponente reagieren.



3) Schutzgruppen

Von der großen Zahl der zur Verfügung stehenden Schutzgruppen sind nur wenige allgemein gebräuchlich (50). Viele werden nur in Sonderfällen verwendet. Man unterscheidet zwischen Amino-, Carboxyl-, Hydroxyl- und Thiol-Schutzgruppen. Im folgenden werden die wichtigsten Schutzgruppen im Hinblick auf die Synthese des Secretins zusammenfassend diskutiert.

Die bewährtesten Aminoschutzgruppen leiten sich vom Urethan ab und sind säurelabil. So wird die Benzyloxycarbonyl-Gruppe (Z-Gruppe) (51) durch HBr in Eisessig oder durch Hydrierung abgespalten, die t.Butyloxycarbonyl-Gruppe (Boc-Gruppe) (52) kann schon mit 1 N HCl in Eisessig oder mit Trifluoressigsäure / Methylenchlorid 1:1 abgespalten werden. Die gleichen Abspaltungsbedingungen gelten für die Adamantyloxycarbonyl-Gruppe (Adoc-Gruppe) (53), während die 1-(p-Biphenylyl)-1-methyl-äthoxycarbonyl-Gruppe (Bpoc-Gruppe) (54) bereits mit verdünnter Essigsäure leicht abgespalten wird. Von den alkalisch abspaltbaren Aminoschutzgruppen ist eigentlich nur die Trifluoracetylgruppe (Tfa-Gruppe) von Bedeutung. Sie läßt sich bereits mit verdünnter Natronlauge oder mit verdünntem Ammoniak abspalten.

Die Carboxylgruppen werden durch Veresterung blockiert. Gebräuchlich sind Methyl- und Äthylester. Die Abspaltung erfordert milde alkalische Hydrolysebedingungen und wird meist in Aceton, Methanol oder Dioxan durchgeführt. Ebenfalls von Bedeutung sind die Benzylester. Die Benzylschutzgruppen werden durch katalytische Hydrierung, durch Hydrazin oder durch Alkali abgespalten. Stabil gegen Hydrazin und auch einigermaßen stabil gegen Alkali sind die t.-Butylester. Sie werden unter leicht sauren Bedingungen abgespalten.

Zur Blockierung der OH-Funktionen wird meist die Benzylgruppe und die t.-Butylgruppe verwendet (55),(56). O-Benzylgruppen werden mit HBr in Trifluoressigsäure oder durch Hydrierung abgespalten und die t.-Butyläther lassen sich leicht in Säuren spalten.

Besondere Schwierigkeiten macht die Blockierung des Imidazol-Stickstoffs im Histidin, da die verfügbaren Schutzgruppen einerseits schwer anzubringen sind und andererseits oft unbeabsichtigt bei der Reaktion wieder abgespalten werden. In letzter Zeit wurde Bis-Adoc-Histidin als leicht zugängliche und einigermaßen stabile Verbindung verwendet (16), während früher meist N^{im}-Benzylhistidin gebräuchlich war, dessen Benzylgruppe durch katalytische Druckhydrierung abgespalten werden kann.

Auch für die Guanidinogruppe des Arginins gibt es noch keine allgemein befriedigende Schutzgruppe. Da die Guanidinogruppe unter den normalerweise bei der Peptidsynthese vorkommenden Bedingungen protoniert bleibt, wird auf eine spezielle Schutzgruppe oft verzichtet (57). Eine Überführung in die Nitroguanidinogruppe (58) verringert den basischen Charakter des Arginins und wird deshalb zur Blockierung verwendet. Allerdings verläuft die anschließende Reduktion der Nitrogruppe durch katalytische Hydrierung oft unvollständig. Auch das von Zervas, Winitz und Greenstein eingeführte Tri-Z-Arginin wird gelegentlich verwendet (59). Dabei werden aber alle drei Schutzgruppen nach erfolgtem Anbau des Arginins gleichzeitig abgespalten, weshalb diese Schutzgruppenkombination nur für N-terminales Arginin sinnvoll ist.

Strategien der Peptidsynthese

1) Klassische Synthese

Die konventionelle Synthese baut unter weitestgehender Maskierung der Seitenkettenfunktionen der Aminosäuren zunächst größere Peptidbruchstücke auf, die dann an-

schließend meist mit Hilfe der Azidmethode zu größeren Einheiten verknüpft werden. Dabei wird das Peptid auf jeder Reaktionsstufe isoliert und gereinigt, so daß einheitliche Produkte entstehen. Dem Aufbau größerer Peptide mit mehr als etwa 30 Aminosäuren steht bei der klassischen Synthese die starke Abnahme der Löslichkeit mit zunehmender Kettenlänge im Wege. So muß bei großen Peptiden mit erheblichen Schwierigkeiten hinsichtlich ihrer Löslichkeit gerechnet werden (60). Deshalb wurden Synthesestrategien entwickelt, die Löslichkeitsschwierigkeiten ausschalten.

2) Träger - Synthesen

Die Trägersynthesen der verschiedensten Variationen überraschen zunächst von ihrer Einfachheit her, die letztlich sogar die Möglichkeit eröffnet, die Synthese von Peptiden zu automatisieren. In der von Merrifield (61) bereits 1963 eingeführten Festphasensynthese wird die C-terminale Aminosäure mit einem unlöslichen, schwach quervernetzten Polystyrolträger verestert und stufenweise N-Acylaminosäuren an die erste Aminosäure angebaut. Da die Kupplung einer Aminosäure bei einer solchen Synthese zu 100 % verlaufen muß um Fehlsequenzen zu vermeiden, müssen erhebliche Überschüsse aktivierter Aminosäurederivate eingesetzt werden (62). Dadurch kann unter anderem als Nebenreaktion eine N-Acylaminoacylierung der Peptidbindung, z. B. am Glycin auftreten, was sogar zu Verzweigungen des synthetisierten Peptids führen kann (63). Ebenso wie die Kupplungsreaktion muß auch die Abspaltung der Schutzgruppen quantitativ verlaufen, damit Fehler- und Rumpfsequenzen vermieden werden. Ein häufig angewendetes Verfahren zur Vermeidung von Fehlsequenzen besteht in der irreversiblen Blockierung nicht umgesetzter Aminofunktionen, so daß dann statt Fehlsequenzen nur Rumpfsequenzen auftreten, die sich vom zu synthetisierenden Produkt besser unterscheiden und damit leichter abtrennbar sind (62). Um Fehlsequenzen auszuschließen, muß eine sichere, quantitative Untersuchung jedes Reaktionsschrittes erfolgen. Dabei sollte aber

die Fehlergrenze dieser Analysen vor allem bei der Darstellung größerer Peptide mindestens in der Größenordnung von ± 0,1 % liegen (60). Solche Analysen erfordern, wenn sie überhaupt durchführbar sind, einen erheblichen Zeitaufwand, der die Schnelligkeit einer Merrifield-Synthese sehr stark einschränkt. Außerdem beruhen die Umsatzkontrollen meist auf Umsetzungen der freigebliebenen Aminogruppen mit speziellen Reagenzien. Da die Kenntnis des umgesetzten Anteils nicht sicher ist, sind Bestimmungen dieser Art bereits mit einem Fehler behaftet. Auch sind Übertragungen von bereits durchgeführten und genau untersuchten Syntheseergebnissen auf ein neues Trägermaterial nicht ohne weiteres möglich, da herstellungsbedingte Unterschiede des Trägers hinsichtlich Korngröße, Quellbarkeit und Zahl der reaktiven Gruppierungen nicht ausgeschaltet werden können. Deshalb ist auch die Automatisierbarkeit der Merrifield-Synthese nur eine rein theoretische Möglichkeit, da eine Synthese ohne Umsatzkontrolle nur unsaubere Produkte liefert und andererseits eine maschinelle Umsatzkontrolle einen erheblichen Aufwand erfordern würde. Allen begründeten Einwänden zum Trotz verwenden bis heute mehrere Autoren automatische Merrifield-Synthesizer, die laufend unkontrolliert erstellte Peptidmischungen liefern, aus denen trotz mühevollster Reinigung doch keine vollständig einheitlichen Peptide isolierbar sind. Damit gereicht die Automatisierung der Synthese eher zum Nachteil als zum Vorteil, da sie gern zu kritikloser Verwendung der Merrifield-Synthese verführt. Da die Peptide in der Festphasentechnik stufenweise aufgebaut werden, sind Fehlsequenzen mit dem gewünschten Produkt strukturell eng verwandt. Deshalb ist eine Abtrennung und Reinigung selbst bei kurzen Peptiden schon recht schwierig, bei Peptiden mit über 10 Aminosäuren unmöglich. Je länger das Peptid ist, umso eher täuschen auch die zur Verfügung stehenden analytischen Methoden ein reines Produkt vor.

Die Merrifield-Synthese verknüpft die C-terminale Aminosäure unter Benzylester-Bindung mit dem unlöslichen, chlormethylierten Harz. Dann werden nach jeweiliger Abspaltung der Aminoschutzgruppen Boc-Aminosäuren mit Hilfe des Carbodiimid-Verfahrens oder mit Hilfe von aktiven Estern unter Maskierung eventueller Drittfunktionen stufenweise angebaut. Dieser Aufbau der Peptidsequenz wird meist unkontrolliert in einem Rhythmus von ca. 2 bis 4 Stunden vorgenommen. Nicht umgesetzte Chlormethylgruppen am Polymer werden oft nicht blockiert, so daß bereits durch eine spätere Veresterung des Trägers mit einer in der Sequenz vorkommenden Aminosäure Fehlpeptide entstehen können. Es ist selbst heute noch nicht möglich, Umsetzungsgeschwindigkeiten der Kupplungsreaktionen genau vorherzusagen. Sie werden einerseits von den beiden an der Verknüpfung beteiligten Aminosäuren, andererseits auch von der Größe und der Art des mit dem Polymer verbundenen Peptids und schließlich auch noch von Diffusionsvorgängen am Polymer beeinflußt. Deshalb müssen die Umsetzungsgeschwindigkeiten für jeden Fall neu bestimmt werden. Auch die neuerdings verwendeten, zu 1 % vernetzten Polystyrole, die einem löslichen Träger sehr nahe kommen (64) und Glass-Beads, bei denen die Peptide an einer Siliciumoxid-Kugeloberfläche wachsen (65), (66), können nur etwas die sterischen Verhältnisse verbessern, die grudsätzlichen Fehlerquellen werden nicht behoben. Somit ist die Merrifield-Synthese, wie sie heute noch durchgeführt wird, für den Aufbau reiner, längerer Peptide nicht empfehlenswert, da auch nach mehreren Reinigungsschritten ein reines Syntheseprodukt kaum zu erhalten ist. Allerdings werden bei mehreren, großen Peptiden, die nach der Merrifield-Technik hergestellt worden sind, biologische Aktivitäten gefunden, was daran zweifeln läßt, ob es möglich ist, die Struktur eines Naturstoffes anhand einer gelungenen Synthese mit biologisch aktivem Endprodukt zu beweisen, da offensichtlich z.B. auch fehlerhafte Peptidsequenzen ähnliche, biologische Eigenschaften aufweisen können wie die reinen

Peptidsequenzen selbst. Als Methode zur schnellen Darstellung von Analoga für Screening Tests bringt sie bei manchen Problemen einigen Zeitvorteil.

Bei der Festphasensynthese treten oft physikalische Schwierigkeiten auf. So ist die Diffusion der Kupplungskomponenten in die feste Matrix beschränkt. Die Zugänglichkeit mancher am Harz befestigten Aminosäuren oder Peptide ist aus sterischen Gründen oder aus Solvatationsgründen behindert. Außerdem bewirkt die heterogene Reaktion zwischen Polymer und Kupplungskomponente eine Verlängerung der Reaktionszeit. Diese physikalisch bedingten Nachteile der Festphasensynthese hat bereits Shemyakin (67) versucht auszuschalten. Er ersetzte den mit Divinylbenzol quervernetzten Polystyrolträger der Merrifield-Synthese durch einen Träger aus linearem, hochmolekularem Polystyrol, der es gestattete, die Reaktion in Lösung durchzuführen und damit Diffusionsprobleme auszuschalten. Diese Syntheseart fand allerdings keine allgemeine Anwendung, da die Löslichkeitseigenschaften des verwendeten linearen Polystyrols nach einigen Reaktionszyklen infolge Quervernetzungen stark abnahmen und damit die Vorteile der homogenen Reaktion wieder aufgehoben wurden. Auch treten bei der Ausfällung des Polystyrols bzw. des Polymerpeptids zur Entfernung der überschüssigen, niedermolekularen Kupplungsreagenzien Einschlüsse auf, wodurch eine vollständige Reinigung nicht möglich ist und damit ebenfalls die Gefahr der Bildung von Fehlsequenzen auftritt.

Eine Methode, die viele Vorteile der Merrifieldsynthese mit denen der klassischen Synthese verbindet, ist die von M. Mutter und E. Bayer gefundene Flüssigphasenmethode (Liquid-Phase-Synthese) (68), (69). Bei dieser Synthese wird die C-terminale Aminosäure mit Polyäthylenglykol (PEG) mit Molekulargewichten von 5000 bis 20 000 verestert. Dieses Polyäthylenglykol erfüllt

eigentlich eine doppelte Aufgabe. Man kann es einerseits als Träger betrachten, der wie bei der Merrifield-Synthese die erste Aminosäure fixiert, an der dann die Peptidsequenz stufenweise aufgebaut wird. Andererseits kann das Polyäthylenglykol als eine Schutzgruppe aufgefaßt werden, die die Eigenschaft besitzt, selbst längere Peptide noch löslich zu machen. Deshalb ist es sinnvoll, die Liquid-Phase-Synthese nicht nur als Trägersynthese, sondern auch als Modifikation der klassischen Synthese zu betrachten. Die Nachteile der Festphasensynthese nach Merrifield werden weitgehend beseitigt. So wird die Reaktion durch den löslichen Träger homogen und damit schneller, und was wichtiger ist, gut kontrollierbar. Es wäre prinzipiell möglich das Peptid vom Träger abzuspalten, einer Zwischenreinigung zu unterziehen und dann wieder am Träger zu fixieren. Allerdings bringt diese Prozedur einen erheblichen Verlust an Peptid mit sich, der diesen möglichen Reinigungsschritt nicht empfehlenswert macht. Die Wahl der Schutzgruppen ist dadurch vereinfacht, daß z. B. auch Hydrierungen am Polyäthylenglykol möglich sind, die beim Polystyrol der Festphasensynthese nicht zur Schutzgruppenabspaltung verwendet werden können. Andererseits bleiben die Vorteile der Merrifield-Synthese, nämlich der standardisierbare, einfache Synthesezyklus und der stufenweise Aufbau der Peptide erhalten, wenn auch die Dauer eines Kupplungszyklus infolge der notwendigen Umsatzkontrollen und auch der etwas zeitraubenderen Abtrennung der niedermolekularen Verunreinigungen vom Polymerpeptid etwas verlängert wird.

Zu Beginn der Entwicklung dieser Synthesemethode wurden niedermolekulare Verunreinigungen durch Ultrafiltration in wässrigem Medium abgetrennt (68). Dies war infolge des Lösungsmittelwechsels, der notwendig war, weil für organische Lösungsmittel keine geeigneten Membranen zur Verfügung standen, und infolge der recht langsamen Ultrafiltration recht zeitraubend.

Heute werden die Überschüsse an Kupplungsreagenzien durch Ausfällung des Polymers aus der Lösung mit Hilfe von Äther sehr leicht und schnell abgetrennt (70). Die überschüssigen Aminosäurederivate bleiben dabei meist in Lösung. Sollte dies nicht der Fall sein, muß gegebenenfalls mehrmals aus Methylenchlorid, aus Äthanol oder aus Dimethylformamid umkristallisiert werden. Ein ähnliches Prinzip wurde bereits 1969 von G. Spach und Mitarbeitern zur Synthese von Copolymeren aus Polyäthylenglykol und Phenylalanin bzw. Glutaminsäure verwendet (71). Die zeitraubende Kristallisation der klassischen Synthese entfällt. Im Gegensatz zum Verfahren von Shemyakin (67) fällt das Polymerpeptid (PEG-Peptid),ebenso wie das PEG selbst, kristallin aus, was durch eine röntgenographische Aufnahme gezeigt werden konnte (70). Damit werden Einschlüsse vermieden, wie sie bei gelartigen Ausfällungen, wie der Ausfällung von Polystyrol nach Shemyakin (67), gerne entstehen, und eine quantitative Entfernung der im Überschuß eingesetzten Aminosäurederivate wird möglich.

PEG ist in den bei der Peptidsynthese verwendeten Lösungsmitteln wie CH_2Cl_2, DMF, Chloroform, Dioxan und Essigester sehr gut löslich. In kaltem Äthanol ist es fast unlöslich, während es in warmem Äthanol sehr leicht löslich ist. Letztere Eigenschaft kann dazu benützt werden, alkohollösliche Aminosäurederivate durch Umkristallisation des PEG-Peptids aus Äthanol von 30 - 35° C vom Polymer abzutrennen. Außerdem ist PEG in Äther unlöslich und mit Hilfe von Äther aus seinen Lösungen in organischen Lösungsmitteln leicht ausfällbar. PEG ist auch in Wasser löslich und kann dann z. B. von wasserunlöslichen Peptiden nach der Abspaltung oder von Dicyclohexylharnstoffresten gut abgetrennt werden. Das Peptid kann durch alkalische oder saure Hydrolyse, durch Ammonolyse, Hydrazinolyse oder durch Umesterung vom PEG abgespalten werden.

Ein Nachteil, der jeder Trägersynthese anhaftet, gilt auch für die Liquid-Phase-Synthese. Es ist die Forde-

rung nach einem vollständigen Kupplungsumsatz, bzw. einer vollständigen Abspaltung der betreffenden Schutzgruppen. Es ist aber bei der Liquid-Phase-Synthese möglich, durch einfache Umsatzkontrollen die Ausbeuten zu bestimmen und eventuell nachzukuppeln bzw. die Abspaltung zu wiederholen. Sollte das nicht zum Erfolg führen, muß entweder die Synthesestrategie geändert werden, oder aber nicht umgesetzte Peptidketten irreversibel blockiert werden um wenigstens Rumpfsequenzen und keine schwer abtrennbaren Fehlsequenzen zu erhalten.

Eine Möglichkeit zur Verbesserung des Trägers wäre vielleicht auch die Verwendung eines monovalenten PEG anstelle des bis jetzt verwendeten bivalenten PEG und die Beseitigung der nicht gekuppelten PEG-Peptid-Moleküle, die sich durch eine freie Aminofunktion auszeichnen, durch Ionenaustauscher in organischen Lösungsmitteln. Dadurch würde dann bei jedem Kupplungsschritt ein vollständiger Umsatz erzielt.

Liquid-Phase-Methode

1) Veresterung der C-terminalen Aminosäure mit dem PEG

Das trockene Polyäthylenglykol mit einem Molekulargewicht von 10 000 wird in Methylenchlorid gelöst, so daß eine 10 %ige Lösung entsteht. Dann wird die geschützte Aminosäure und Dicyclohexylcarbodiimid im Verhältnis 1:1 in ca. dreifachem Überschuß, bezogen auf die freien OH-Gruppen des PEG, zugegeben und einen Tag bei Zimmertemperatur gerührt. Dann wird noch zweimal im Abstand von einem Tag der gleiche Überschuß an Boc-Aminosäure und DCCI zugegeben. Die Reaktion ist nach 4 bis 5 Tagen beendet. Es muß versucht werden, möglichst eine 100 %ige Veresterung aller freien OH-Gruppen zu erreichen, da sonst durch spätere Reaktionen mit diesen OH-Gruppen Fehlsequenzen entstehen können. Nach beendeter Reaktion wird das Polymer mit Äther ausgefällt und so lange aus Methylenchlorid

und Äther bzw. Äthanol und Äther umgefällt, bis die überschüssigen Kupplungskomponenten entfernt sind. Dies läßt sich schnell und einfach durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten in Butanol-Eisessig-Wasser-Systemen prüfen, da der R_f-Wert des PEG bzw. des PEG-Peptids bei Null liegt und die Aminosäurederivate bereits nach wenigen Minuten Laufzeit auf der Dünnschichtplatte abgetrennt werden. Ein kleiner Teil des veresterten Polyäthylenglykols wird in 6 N HCl bei 110° C 24 Stunden lang hydrolysiert. Aus dem Hydrolysat wird mit Hilfe einer Aminosäureanalyse die Beladung des Trägers festgestellt. Durch Nachveresterung muß evtl. die Beladung erhöht werden. Die Veresterung ist nur auf etwa ± 5 % reproduzierbar.

2) Abspaltung der Schutzgruppen

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Flüssigphasen-Synthesen wurde als Schutzgruppe für die α-Aminofunktion die säurelabile Boc-Gruppe verwendet. Diese wird in einer 10 %igen Lösung von PEG-Peptid in 1,2 N HCl in Eisessig innerhalb von 20 bis 30 Minuten abgespalten. Anschließend wird das Polymer mit Äther ausgefällt und säurefrei gewaschen. Mit Hilfe eines IR-Spektrums kann jeweils die Vollständigkeit der Abspaltung untersucht werden (72). Das IR-Spektrum wird mit Hilfe eines KBr-Preßlings aufgenommen. Die Urethanbindung der Aminoschutzgruppe zeichnet sich durch eine charakteristische Bande im IR-Spektrum bei 1710 cm^{-1} aus, die der C=O-Streckschwingung entspricht. Bei vollständiger Abspaltung der Schutzgruppe verschwindet diese Bande vollkommen. Quantitative Untersuchungen haben gezeigt, daß 1 % nicht abgespaltener Schutzgruppe noch deutlich im IR-Spektrum zu erkennen ist (72). Abb. 1 und 2 zeigen IR-Spektren von Boc-L-Val-PEG und H-L-Val-PEG. Neben den charakteristischen Banden des PEG bei 1110 cm^{-1} zeigen beide Spektren eine Esterbande bei 1760 cm^{-1}, die der C=O-Streckschwingung des Esters entspricht.

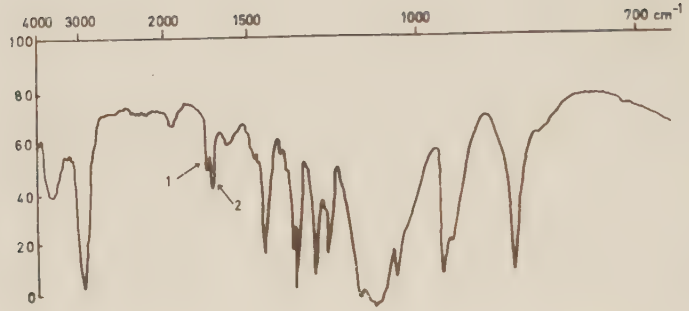


Abb. 1: IR-Spektrum von Boc-L-Val-PEG
1 = Ester-, 2 = Urethanbande

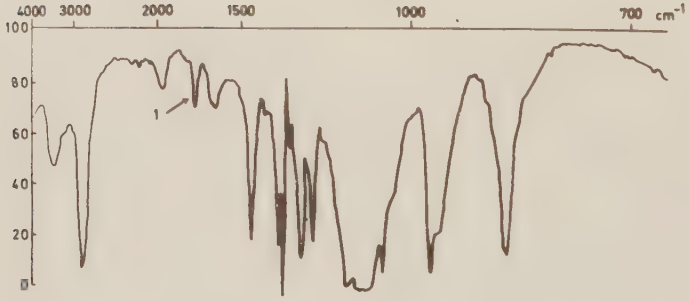
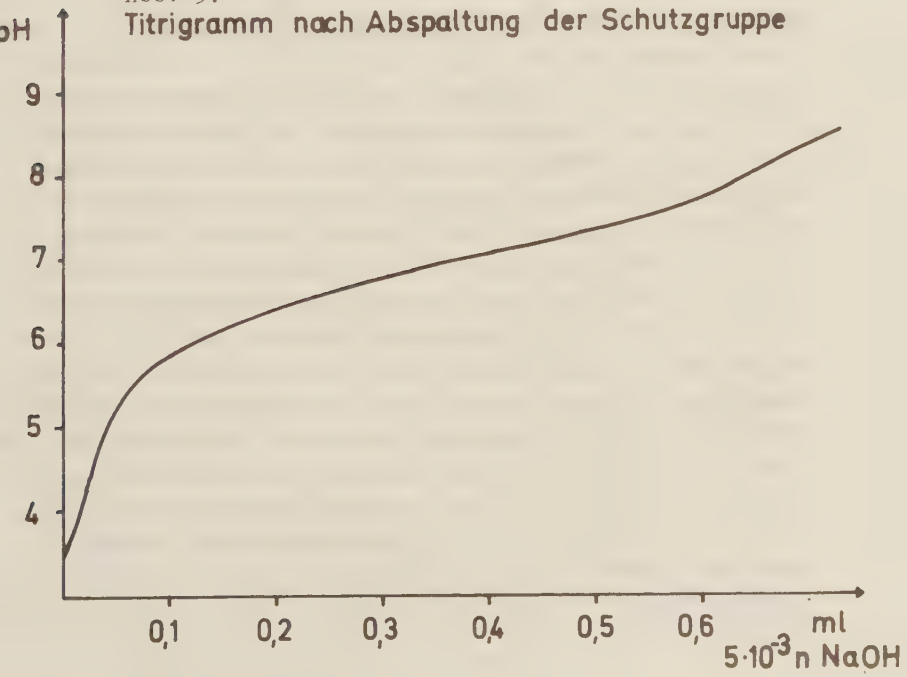


Abb. 2: IR-Spektrum von H-L-Val-PEG
1 = Esterbande

Ist außer der α-Aminoschutzgruppe noch eine weitere Urethanschutzgruppe, z. B. die Z-Gruppe, an irgendeine Seitenfunktion des Peptids gebunden, versagt die Umsatzkontrolle mit Hilfe eines IR-Spektrums, da die Urethanbande auch nach der Boc-Abspaltung erhalten bleibt. Deshalb wurde versucht, die Zahl der freien Aminofunktionen durch Titration der als Hydrochlorid vorliegenden Aminogruppen mit Natronlauge zu bestimmen (73). Ein Vergleich der Beladung, die durch Titration bestimmt wurde, mit der durch Hydrolyse und anschließender Aminosäureanalyse bestimmten Beladung brachte eine vollständige Übereinstimmung (73).

Zur Titration nach der Schutzgruppenabspaltung werden ca. 10 - 20 mg PEG-Peptid, d. h. ca. 2 - 4 Mol Aminhydrochlorid mit 5 x 10^{-3} N NaOH an einem Mikrodosimat der Firma Metrohm titriert. Auf diese Weise können nicht abgespaltene Schutzgruppen quantitativ bestimmt werden, sofern die Beladung des Polyäthylenglykols bekannt ist.

Abb. 3:
Titrigramm nach Abspaltung der Schutzgruppe



Mit dieser Bestimmungsmethode ist auch eventuell noch vorhandene Essigsäure oder HCl im Titrigramm zu sehen, die sonst kaum feststellbar wären. Diese Säure kann dann bei Bedarf entfernt werden, damit bei der nachfolgenden Kupplungsreaktion keine Acetylierungen der Aminogruppen auftreten. Eine Blockierung des betreffenden Peptids für die weitere Synthese und damit die Entstehung von Rumpfsequenzen wird dadurch vermieden.

3) Kupplungsreaktionen und Umsatzkontrollen

Zu einer 10 %igen Lösung von PEG-Peptid in Methylenchlorid gibt man je nach Aminosäure einen drei- bis achtfachen Überschuß an voraktivierter Aminosäure (z.B. symmetrisches Anhydrid aus geschützter Aminosäure und DCCI) (34) , neutralisiert mit N-Methylmorpholin und läßt ein bis zwei Stunden reagieren. Dann wird die Lösung eingeengt, mit Äther ausgefällt und zur Entfernung der Überschüsse an Kupplungskomponenten aus Äthanol umkristallisiert. Dadurch werden auch letzte Reste des N-Methylmorpholins entfernt, das bei der Umsatzkontrolle durch Titration stören würde. Zur Umsatzkontrolle bei den durchgeführten Synthesen wurde die semiquantitative Ninhydrinmethode oder besser die Titration verwendet. Da die Empfindlichkeit der Ninhydrinreaktion bei 0,1 μ Mol liegt, muß zum Nachweis von 1 % freier Aminogruppen mindestens 10 μ Mol Substanz eingesetzt werden. Durch Vergleich mit mehreren Standards kann der Umsatz einigermaßen genau bestimmt werden. Als Ninhydrinreagenz wird Stein-Moore-Lösung verwendet (74). Die Ninhydrinreaktion wird bei ca. 80° C im Wasserbad innerhalb 15 bis 20 Minuten durchgeführt. Diese Umsatzkontrolle kann auch direkt aus der Reaktionslösung während der Reaktion ausgeführt werden, indem ein Teil der Reaktionslösung jeweils mit Ninhydrin umgesetzt wird. Dadurch läßt sich der Verlauf und das Ende der Reaktion einigermaßen feststellen. Durch photometrische Messungen kann der Umsatz mit einer Genauigkeit von ± 1 % bestimmt werden (72).

Zur genaueren Bestimmung des Umsatzes können die nicht gekuppelten Aminogruppen, die protoniert vorliegen, mit Natronlauge titriert werden. Aus dem Titrigramm ist gleichzeitig ersichtlich, ob das PEG-Peptid noch durch geschützte Aminosäuren verunreinigt ist, was aber auch in einem Dünnschichtchromatogramm nachgewiesen werden kann. Zur Steigerung der Empfindlichkeit kann dem zu titrierenden PEG-Peptid ein Standard, z. B. 1 µMol Glycinmethylesterhydrochlorid, zugesetzt werden, damit die bei der Titration auftretenden Wendepunkte auch bei hohen Umsatzraten noch genau bestimmt werden können, wenn nur wenig freies Amin am PEG vorhanden ist (73). Bei nicht vollständigem Umsatz muß einmal oder auch mehrmals nachgekuppelt werden, bis ein vollständiger Umsatz erreicht wird. Nach erfolgter Kupplung wird wie oben angegeben die Schutzgruppe abgespalten und die nächste Aminosäure angekuppelt.

4) Abspaltung des Peptids vom Polyäthylenglykol

a) Abspaltung durch Ammonolyse

Das PEG-Peptid wird in einer Mischung von DMF und Methanol gelöst und mit trockenem, flüssigem Ammoniak im Überschuß versetzt. Dann wird bei Zimmertemperatur in einer Ampulle je nach C-terminaler Aminosäure einen bis fünf Tage lang abgespalten. Das Lösungsmittel wird entfernt und anschließend je nach Löslichkeit des Peptids aufgearbeitet. Ist das Peptid nicht in Alkohol löslich, wie es im vorliegenden, C-terminalen, voll geschützten Tridecapeptidamid des Secretins der Fall ist, kann das Polyäthylenglykol durch Behandeln mit warmem Alkohol abgetrennt werden. Letzte Reste des Trägers können bei Bedarf durch Säulenchromatographie an Sephadex-Gelen abgetrennt werden.

b) Abspaltung durch Hydrazinolyse

Zu einer 10 %igen Lösung von PEG-Peptid in Methanol gibt man einen zehn- bis fünfzehnfachen Überschuß an Hydrazinhydrat, bezogen auf das an den Träger gebundene Peptid und spaltet bei Zimmertemperatur drei bis vier Stunden ab. Die Abspaltung kann durch Dünnschichtchromatographie verfolgt werden. Dann wird neutralisiert, das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in warmem Äthanol aufgenommen, sofern das Peptid in Äthanol löslich ist und das Polyäthylenglykol in der Kälte ausgefällt. Dabei bleiben alkohollösliche Peptide in Lösung und können auf diese Weise vom Träger abgetrennt werden. Dann wird der Alkohol abgezogen, das in Wasser meist unlösliche,voll geschützte Peptid mit Wasser behandelt um restliches Polyäthylenglykol, das wasserlöslich ist, zu entfernen. Dann kann das Peptid abfiltriert bzw. abzentrifugiert werden und eventuell weiteren Reinigungsschritten unterzogen werden.

Strategie der Secretinsynthese

Die Synthese des Secretins wird mit Hilfe von Fragmentkondensationen durchgeführt. Die Auswahl der Fragmente ist so getroffen, daß die Synthese möglichst variabel ist. Das Arginin der natürlichen Secretinsequenz ist in der vorliegenden Arbeit durch Ornithin ersetzt. Es hat sich z. B. bei der Synthese des LH-RH (75), des Vasopressins oder des Vasotocins (76) gezeigt, daß auch ornithinanaloge Argininpeptide biologische Aktivität aufweisen. Es besteht andererseits die Möglichkeit, Argininpeptide durch Guanidierung ihrer Ornithinanalogen zu synthetisieren. Diese Reaktion hat bereits Christensen im Jahre 1945 (77) und später Fruton (78) aufgezeigt. Da Arginin während der Peptidsynthese infolge unbefriedigender, reversibler Blockierungsmöglichkeit seiner stark basischen Guanidinogruppe größere Schwierig-

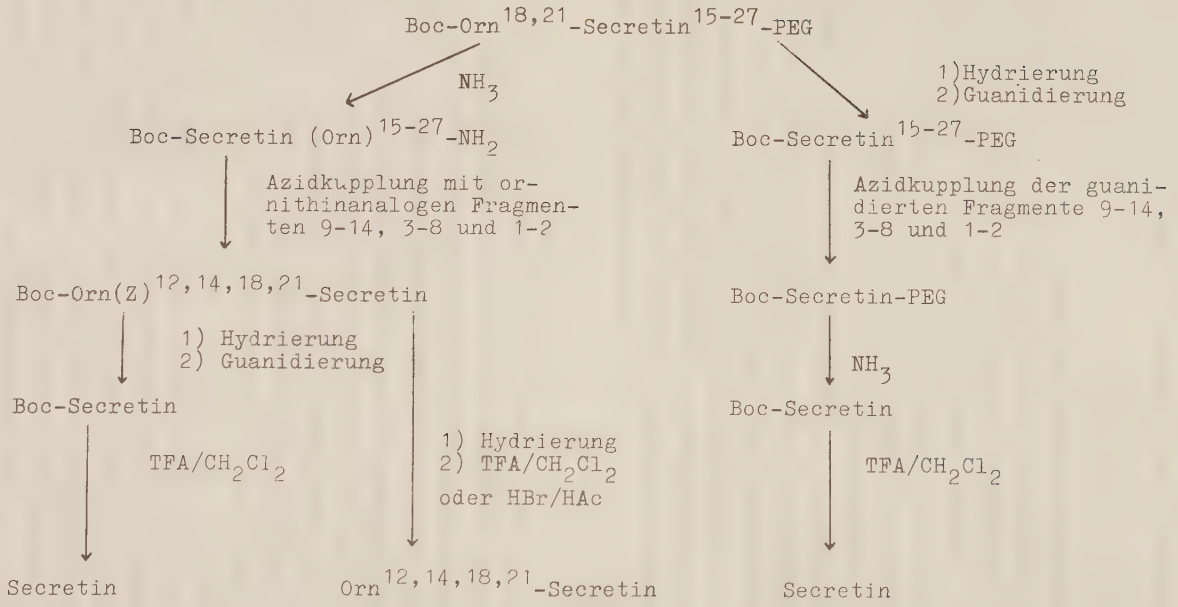
keiten bereitet, liegt es auf der Hand, während der Synthese der Peptidkette Ornithin einzusetzen und dieses Ornithin dann nach erfolgter Synthese selektiv zu guanidieren.

Die Schutzgruppen der einzelnen Fragmente sind so gewählt, daß einerseits das ornithinanaloge Secretin synthetisiert werden kann und andererseits die einzelnen Fragmente sowohl am Polyäthylenglykol als auch nach der Abspaltung vom Träger oder auch die Gesamtsequenz nach der Fragmentkondensation guanidiert werden können. (Vgl. Schema S. 26) Im Gegensatz zu dem bei der Merrifieldsynthese üblichen Polystyrolträger ist ein Peptid am Polyäthylenglykol hydrierbar, so daß auch hydrolyseempfindliche Schutzgruppen verwendet werden können. Eine Guanidierung am Träger hätte den Vorteil, daß eine Abtrennung des Peptids vom überschüssigen Guanidierungsreagenz unproblematisch wäre. Allerdings könnten dann evtl. Löslichkeitsschwierigkeiten bei der Fragmentkondensation der Argininsequenzen auftreten.

Um eine solch variable Synthesestrategie zu erhalten, muß die δ-Aminofunktion des Ornithins nach dem Sequenzaufbau selektiv deblockierbar sein, während bei der Abspaltung der α-Aminoschutzgruppe beim Sequenzaufbau die δ-Aminoschutzgruppe stabil bleiben muß. Dies wird in der vorliegenden Synthese durch die Verwendung der bewährten Boc-Schutzgruppe für die α-Aminofunktionen und der Z-Gruppe für die δ-Aminofunktionen des Ornithins erreicht.

Eine besondere Schwierigkeit bereiten die ω-Carboxylfunktionen der Glutaminsäure und der Asparaginsäure. Einerseits sollten diese Schutzgruppen säurestabil sein, um bei der Abspaltung der α-Aminoschutzgruppen erhalten zu bleiben, andererseits sollten sie auch alkalistabil bzw. stabil gegen Ammoniak und Hydrazin sein, damit bei der Abspaltung der Fragmente vom Träger keine unerwünsch-

Synthesestrategie des Secretins



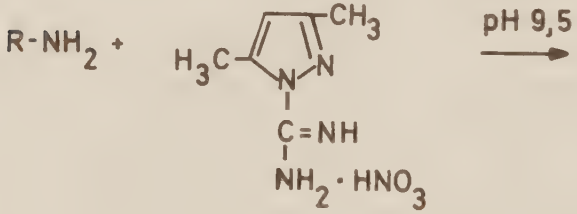
ten Produkte entstehen, da ein Aufbau der gesamten Sequenz an einem Stück nicht sinnvoll erscheint. Eine solche Schutzgruppe ist für Routinesynthesen leider nicht existent. Deshalb wird während der vorliegenden Synthese auf Säurestabilität der Schutzgruppe verzichtet, was bedeutet, daß bei der Verwendung von Boc-Aminosäuren während des Aufbaus der Peptidkette nach dem Anbau von Glutaminsäure bzw. Asparaginsäure die Sequenz abgebrochen werden muß. Dadurch ist bereits die Größe der einzelnen Fragmente festgelegt. Secretin wird in vier Fragmente aufgeteilt und zwar Fragment 1-2, Fragment 3-8, Fragment 9-14 und Fragment 15-27. Die für die Blockierung der ω-Carboxylfunktionen verwendete t.-Butylgruppe ist stabil gegen Hydrazin und Ammoniak, deshalb kann sie sowohl für das C-terminale Fragment, das durch Ammonolyse abgespalten werden muß, als auch für die anderen Fragmente, die durch Hydrazinolyse abgespalten werden, verwendet werden. Damit ist die Kupplungsmethode der einzelnen Fragmente ebenfalls festgelegt. Es kann nur mit Hilfe der Azid-Methode gekuppelt werden, die auch infolge ihrer weitgehenden Racemisierungsfreiheit empfehlenswert ist. Sie verläuft allerdings nicht unbedingt mit hohen Ausbeuten. Eine DCCI-Kupplung der Fragmente scheidet aus, da die t.-Butylester sowohl bei der alkalischen Hydrolyse des Peptids vom Träger nicht unbedingt stabil bleiben und erst recht bei der Abspaltung der Boc-Schutzgruppen an der α-Aminofunktion abgespalten werden.

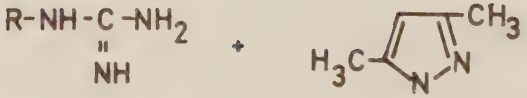
Guanidierung

Zur Guanidierung von Peptiden stehen mehrere Guanidierungsmittel zur Wahl. Der von W. L. Hughes verwendete O-Methylisoharnstoff (79) ersetzt die basische δ-Aminogruppe des Ornithins durch die basischere Guanidinogruppe. Er ist reaktiver als der von Schütte verwendete S-Methylisoharnstoff und das Cyanamid selbst (80). Schütte berichtet, daß die Guanidierung mit S-Methylisoharnstoff bei Zimmertemperatur Wochen erfordert und

daß mit Cyanamid die Reaktion sogar Monate braucht. Allerdings ist O-Methylisoharnstoff im Gegensatz zu S-Methylisoharnstoff in wässrigen Systemen nicht sehr stabil. Auch ist eine optimale Reaktion erst bei einem pH-Wert von 10,5 bis 11 zu erreichen, was für einige Proteine bereits schädlich sein könnte. Deshalb hat Habeeb für die Guanidierung an Peptiden 1-Guanyl-3,5-dimethylpyrazolnitrat als Guanidierungsreagenz vorgeschlagen (81). Diese Verbindung guanidiert Peptide bereits bei pH 9,5 in kürzerer Zeit. 1-Guanyl-3,5-dimethylpyrazolnitrat ist bei Kühlung längere Zeit haltbar, bei höherer Temperatur ist es hydrolyseempfindlich und zerfällt in Harnstoff und 3,5-Dimethylpyrazol.

Reaktionsschema für die Guanidierung:





Die Reaktionsdauer bei pH 9,5 bis 10 beträgt je nach Peptid ca. 2 - 7 Tage, die Reaktion läuft bei Verwendung genügender Überschüsse an Guanidierungsreagenz vollständig ab.

Synthese der Ornithin - Tripeptide

Zum Studium des Ornithins während der Synthese und für Guanidierungsversuche wurden drei ornithinhaltige Tripeptide synthetisiert, die in der ornithinanalogen Secretinsequenz enthalten sind. Diese Peptide wurden in Vorsynthesen schon einmal während der Diplomarbeit synthetisiert (22). Es handelt sich hierbei um

1) Fragment 11 - 13 Boc-L-Ser-Orn(Z)-Leu-OMe
2) Fragment 17 - 19 Boc-L-Ala-Orn(Z)-Leu-OMe
3) Fragment 20 - 22 Boc-L-Gln-Orn(Z)-Leu-OMe

In dieser Arbeit wurde eine spektroskopische Charakterisierung dieser Peptide durchgeführt, die als Modelle für die bei der Totalsynthese des Secretins durchzuführenden Reaktionen dienen.

Dipeptid Boc-L-Orn(Z)-Leu-OMe

Das Dipeptid Boc-L-Orn(Z)-Leu-OMe wurde auf klassische Weise aus Leucinmethylester und Boc-Orn(Z)-OH durch DCCI-Kupplung in Methylenchlorid synthetisiert. Es konnte durch Umkristallisation dünnschichtchromatographisch rein erhalten werden. Aminosäureanalyse und Elementaranalyse ergaben Werte, die mit den berechneten Werten übereinstimmten. Als weiterer Beweis für die Richtigkeit der Verbindung wurde ein ^{13}C-NMR-Spektrum aufgenommen. (Siehe Abb. S. 31)

Guanidierung des Dipeptids t.Butyloxycarbonyl-L-ornithyl-leucinamid (Boc-L-Orn-Leu-NH_2)

Um für eine Guanidierung des Secretins eine einfache und möglichst leicht zugängliche Modellsubstanz zu erhalten, wurde der Dipeptidester mit Ammoniak in das Dipeptidamid überführt und die δ-Aminoschutzgruppe des Ornithins durch Hydrierung mit Palladium-Aktivkohle abgespalten. Dieses Dipeptid wurde mit 1-Guanyl-3,5-dimethylpyrazolnitrat (81) innerhalb von 6 Tagen bei pH 9,5 und Zimmer-

temperatur vollständig guanidiert, was durch das Fehlen von Ornithin und das Auftreten von Arginin in der Aminosäureanalyse gezeigt werden konnte. Allerdings ist die Trennung vom Guanidierungsmittel bei solch kleinen Peptiden schwierig, da die bei Enzymguanidierungen übliche Dialyse nicht eingesetzt werden kann. Deshalb müssen zur Abtrennung chromatographische Verfahren angewendet werden.

Darstellung der Tripeptide Boc-L-Ser-Orn(Z)-Leu-OMe, Boc-L-Ala-Orn(Z)-Leu-OMe, Boc-L-Gln-Orn(Z)-Leu-OMe

Zur Darstellung der Tripeptide wurde Boc-L-Serin mit freier OH-Gruppe bzw. Boc-L-Alanin mit Hilfe der DCCI-Kupplung in Methylenchlorid an das Dipeptid H-L-Orn(Z)-Leu-OMe gekuppelt. Boc-L-Glutamin wurde als p-Nitrophenylester eingesetzt und in Dimethylformamid an das Dipeptid gekuppelt. Alle drei Tripeptide konnten kristallin gewonnen werden. Sie waren dünnschichtchromatographisch einheitlich und auch ihre bei der Aminosäureanalyse und bei der Elementaranalyse gefundenen Werte stimmten mit den berechneten Werten überein. Zur Bestätigung der Struktur wurden ^{13}C-NMR-Spektren der Tripeptide aufgenommen.
(Siehe Abb. S. 31 und 32)

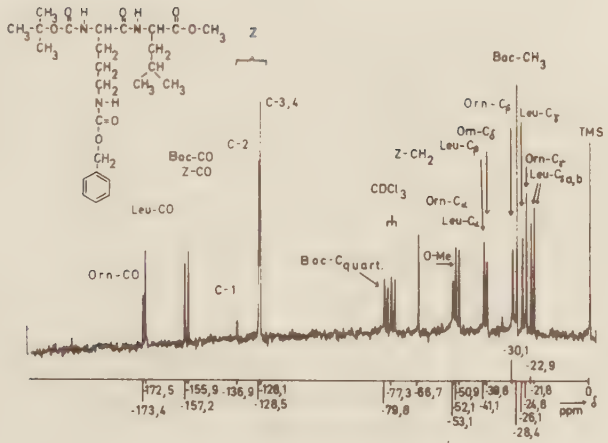


Abb. 4 : PFT-^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-L-Orn(Z)-Leu-OMe

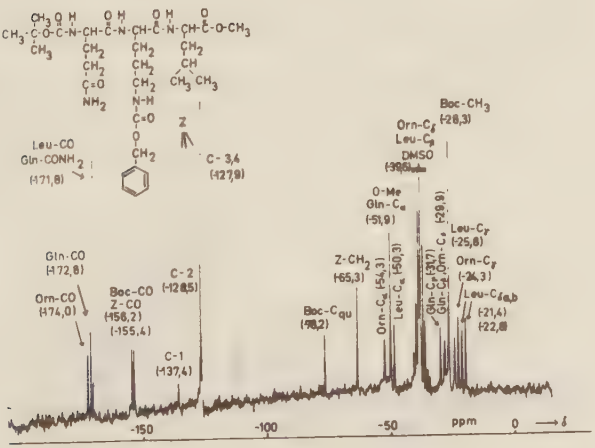


Abb. 5 : PFT-^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-L-Gln-Orn(Z)-Leu-OMe

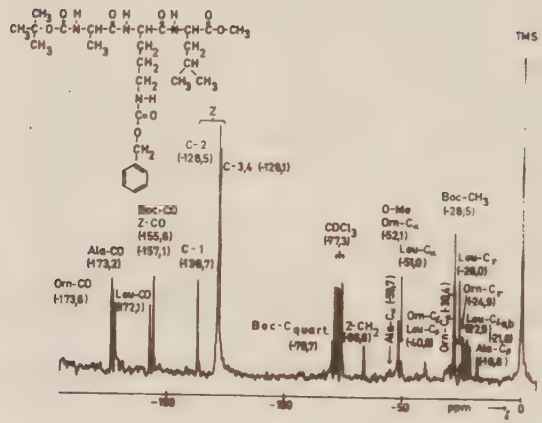


Abb. 6 : PFT-^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-L-Ala-Orn(Z)-Leu-OMe

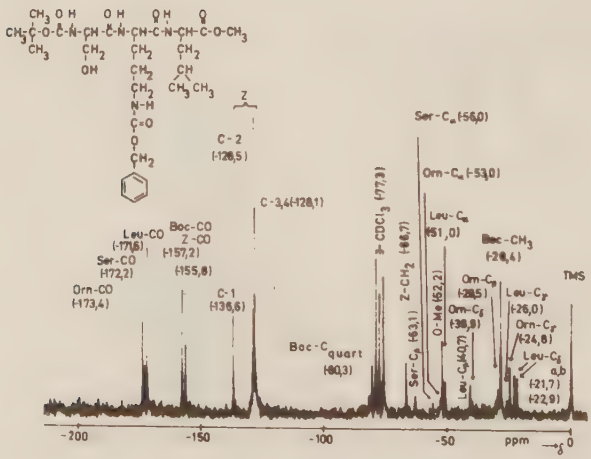


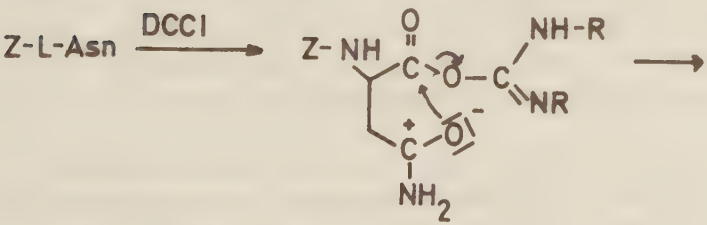
Abb. 7 : PFT-^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-L-Ser-Orn(Z)-Leu-OMe

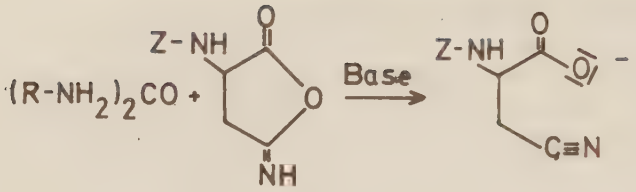
Synthesen der kupplungsfähigen Secretinfragmente

Synthese des Fragments I (Sequenz 15-27)

Zur Synthese des Fragments I (15-27) wurden alle α-Aminofunktionen mit der t.-Butyloxycarbonylgruppe geschützt. Diese Boc-Gruppen wurden während der Synthese jeweils mit HCl/Eisessig abgespalten. Als Schutzgruppe für die δ-Aminofunktion des Ornithins wurde die Z-Schutzgruppe verwendet (82). Außer Boc-L-Glutamin wurden alle Aminosäurederivate nach Voraktivierung mit DCCI (34) als symmetrische Anhydride gekuppelt. Dadurch wurde einerseits der ausgefallene Harnstoff bereits vor der eigentlichen Kupplung entfernt und andererseits das Risiko von Nebenreaktionen, z. B. Veresterung mit nicht umgesetzten OH-Funktionen des Polyäthylenglykols, verringert. Boc-Glutamin wurde als p-Nitrophenylester in Dimethylformamid gekuppelt. Diese Kupplungsart vermeidet die durch intramolekulare Dehydratisierung auftretende Nitrilbildung an der Säureamidfunktion des Glutamins, die mit DCCI während der Kupplung passieren könnte (83), (84), (85).

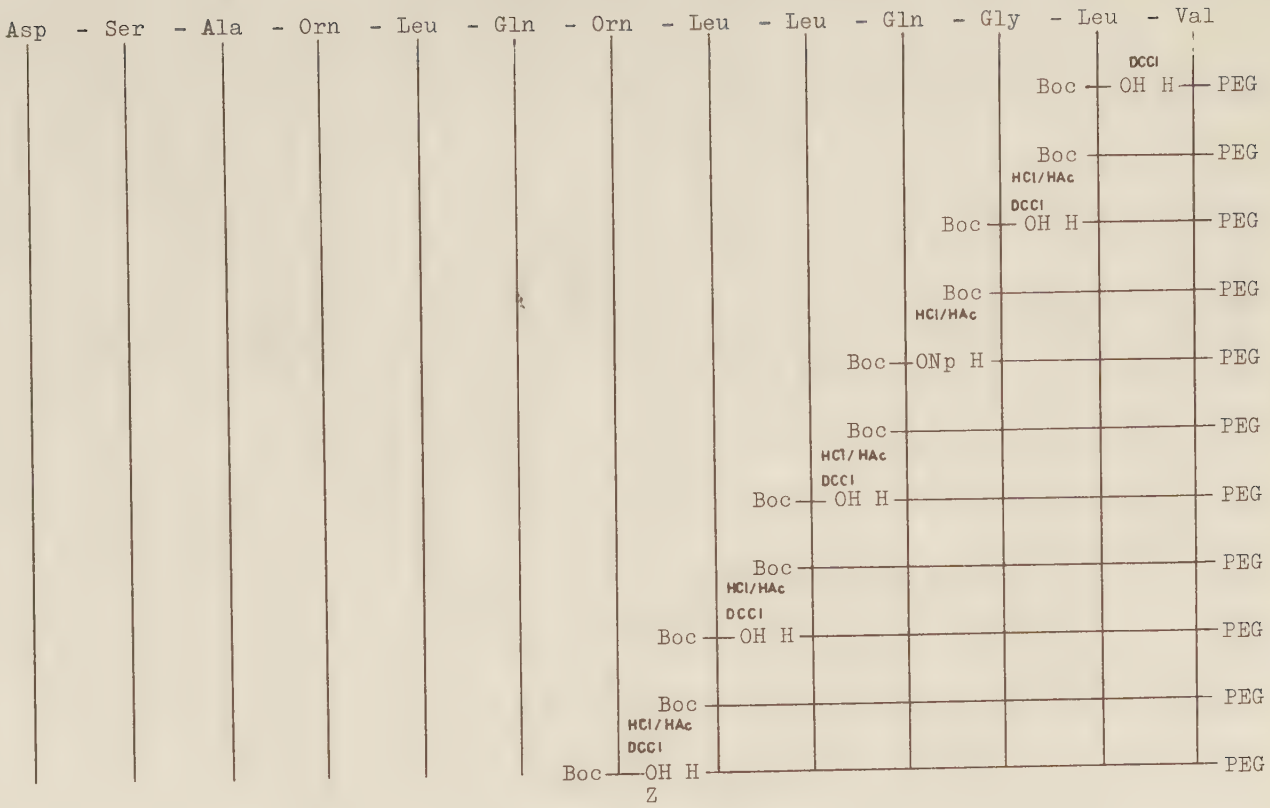
Wie durch ^{18}O-Untersuchungen gezeigt wurde (86), verläuft die intramolekulare Dehydratisierung am Asparagin durch Dicyclohexylcarbodiimid auf folgendem Wege:

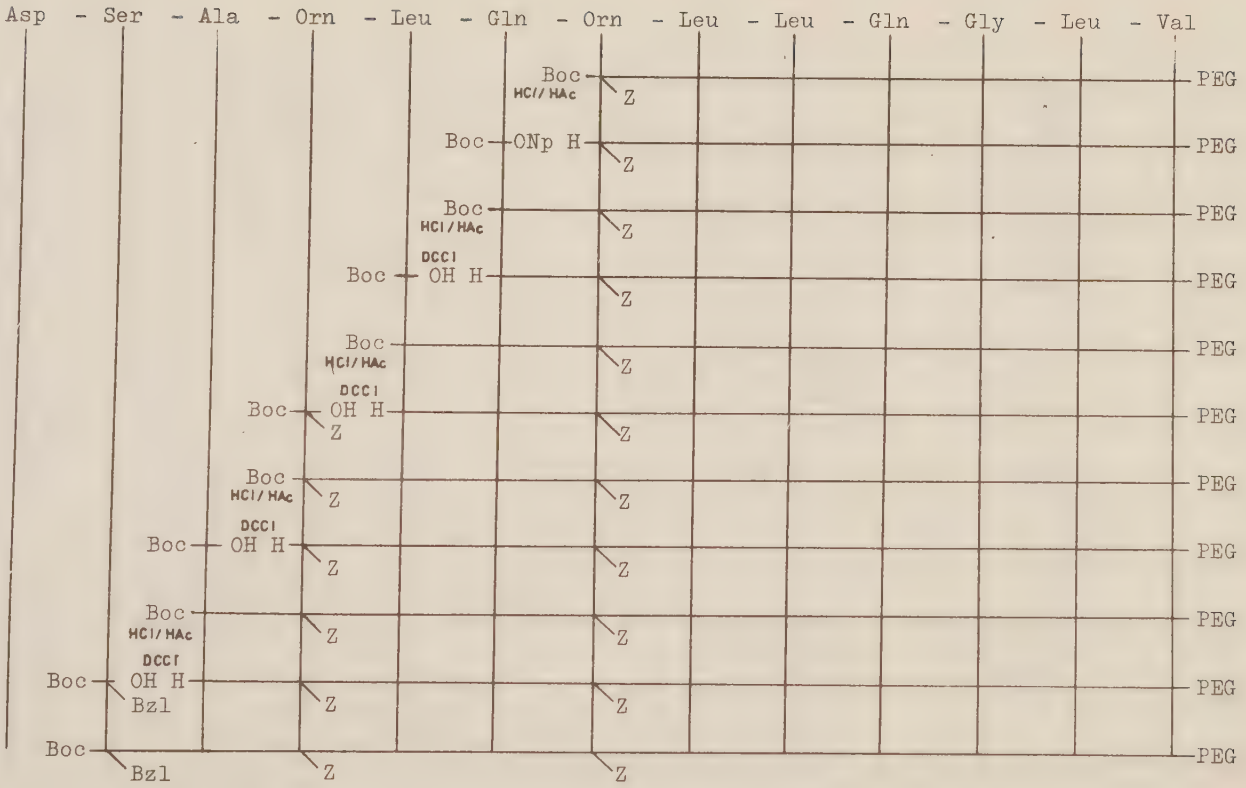


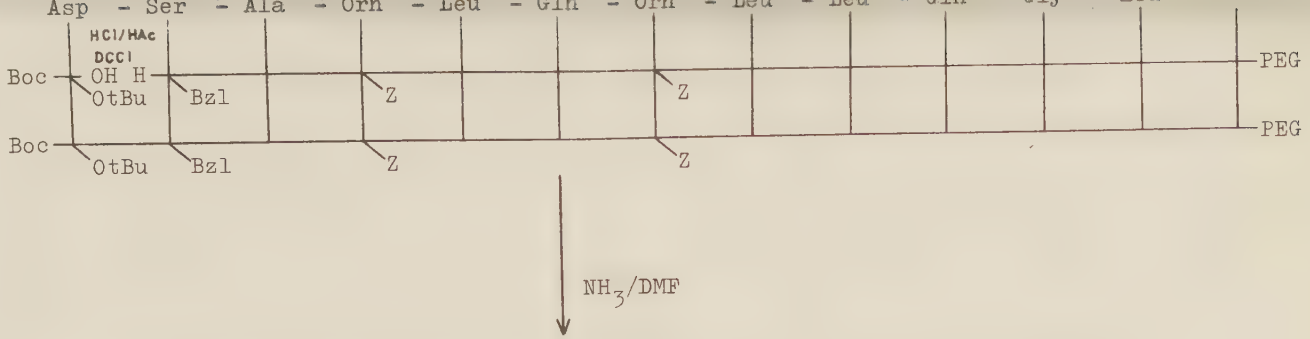


Wie aus diesem Reaktionsschema ersichtlich ist, muß zur Bildung dieses Nitrils ein Molekül Asparagin bzw. Glutamin mit einem Molekül DCCI reagieren. Zur Voraktivierung verwendet man aber Boc-Aminosäuren und DCCI im Verhältnis 2:1. Hagenmaier und Frank (34) haben als Hauptprodukt bei einer solchen Voraktivierung symmetrische Anhydride gefunden. B. Hemmasi und E. Bayer (23) haben bei Synthesen mit Glutamin und Voraktivierung durch DCCI ebenfalls keine Bildung von 2-Amino-4-cyanobuttersäure gefunden. Sie führen das auf die schnelle und vollständige Anhydridbildung der im Verhältnis 2:1 (Glutamin : DCCI) vorliegenden Komponenten zurück. Die Kupplung mit aktivem Ester umgeht die Gefahr der Nitrilbildung, da das aktivierte Derivat vor der Kupplungsreaktion isoliert und gereinigt wird, wobei eventuell gebildetes Nitril abgetrennt wird. Die Kupplung mit p-Nitrophenylestern verlangt allerdings größere Überschüsse an Kupplungskomponente und längere Reaktionszeiten, was dann möglicherweise zu Nebenreaktionen und Racemisierung Anlaß geben könnte. Über solche Nebenreaktionen wurde jedoch bislang bei den Secretinsynthesen von Bodanszky, die ausschließlich mit p-Nitrophenylestern durchgeführt wurden, nichts berichtet (11).

Die Hydroxylgruppe des Serins wurde als Benzyläther blockiert. Die β-Carboxylfunktion der Asparaginsäure wurde durch Veresterung als t.-Butylester blockiert. Dieser Ester wird als einigermaßen stabil bei der Ammono-


Asp - Ser - Ala - Orn - Leu - Gln - Orn - Leu - Leu - Gln - Gly - Leu - Val
DCCI
Boc OH H PEG
Boc PEG
HCl/HAc
DCCI
Boc OH H PEG
Boc PEG
HCl/HAc
Boc ONp H PEG
Boc PEG
HCl/HAc
DCCI
Boc OH H PEG
Boc PEG
HCl/HAc
DCCI
Boc OH H PEG
Boc PEG
HCl/HAc
DCCI
Boc OH H PEG
Z


Asp - Ser - Ala - Orn - Leu - Gln - Orn - Leu - Leu - Gln - Gly - Leu - Val
Boc
HCl/HAc
Z
Boc
ONp H
Z
Boc
HCl/HAc
Z
Boc
DCCI
OH H
Z
Boc
HCl/HAc
Z
Boc
DCCI
OH H
Z
Boc
HCl/HAc
Z
Boc
DCCI
OH H
Z
Boc
HCl/HAc
Z
Boc
DCCI
OH H
Bzl
Z
Boc
Bzl
Z
PEG



Boc-L-Asp(OtBu)-Ser(Bzl)-Ala-Orn(Z)-Leu-Gln-Orn(Z)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH_2

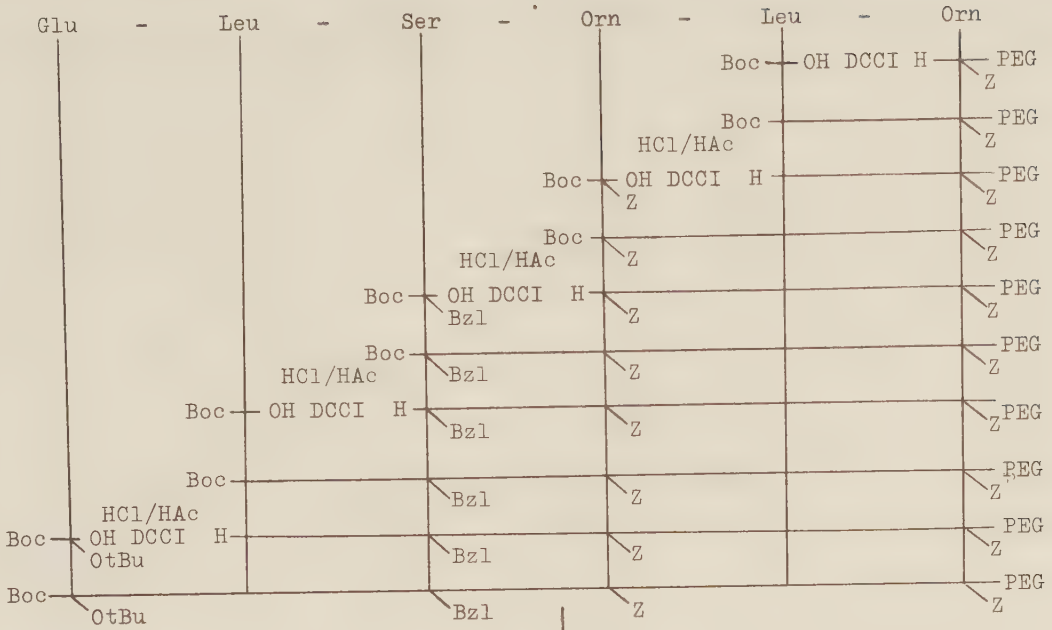
lyse und bei der Hydrazinolyse angesehen, was bei der Abspaltung des Peptids vom Träger von Bedeutung ist, wenn die anschließende Fragmentkondensation nach der Azidmethode durchgeführt werden soll.

Die Abspaltung des Peptids, Fragment 15-27, vom Polyäthylenglykol gelingt in einer Mischung von Methanol und Dimethylformamid mit flüssigem Ammoniak bei Zimmertemperatur in einer Ampulle. Die Ausbeute betrug 28 % bezogen auf das mit dem PEG veresterte Peptid. Das erhaltene Peptid ist dünnschichtchromatographisch und elektrophoretisch einheitlich. Die durchgeführte Aminosäureanalyse zeigt eine gute Übereinstimmung mit den theoretischen Werten. Deshalb wurde auf eine chromatographische Reinigung des Produkts verzichtet, zumal die Löslichkeit des abgespaltenen Peptid sehr schlecht ist.

Synthese des Fragments II (Sequenz 9-14)

Die Sequenz 9-14 wurde ebenso wie das Fragment I nach der Liquid-Phase-Synthese stufenweise mit DCCI als Kupplungsreagenz und der Boc-Gruppe als α-Aminoschutzgruppe synthetisiert. (Siehe Syntheseschema S. 39) Als Seitenschutzgruppen wurden die Z-Gruppe für Ornithin, die Benzylgruppe für Serin und die t.-Butylgruppe für Glutaminsäure verwendet. Die Abspaltung vom Polyäthylenglykol wurde mit Hilfe eines fünfzehnfachen Überschusses an Hydrazinhydrat in Methynol durchgeführt. Das abgespaltene Peptid was dünnschichtchromatographisch einheitlich. Seine Aminosäureanalyse und seine Elementaranalyse entsprachen den theoretischen Werten. Eine Chromatographie auf einer Sephadex LH 20 - Säule von einem Meter Länge mit Methanol als Laufmittel ergab einen einheitlichen Peak. (Elutionsdiagramm siehe S. 40)

Syntheseschema zur Darstellung des Fragments II (Sequenz 9-14)



Boc-L-Glu(OtBu)-Leu-Ser(Bzl)-Orn(Z)-Leu-Orn(Z)-N_2H_3

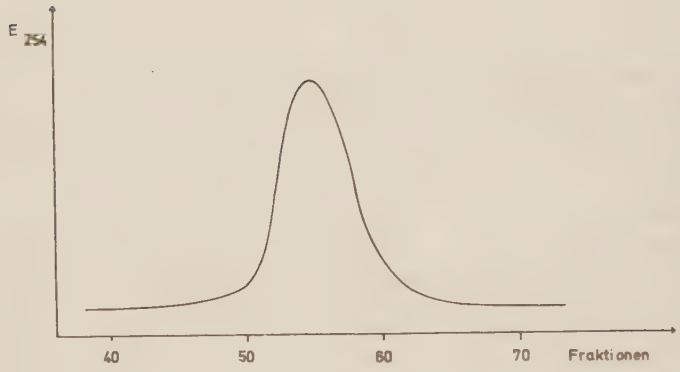


Abb. 8 : Elutionsdiagramm des Fragments II (Sephadex-LH-20, Methanol)

Synthese des Fragments III (Sequenz 3-8)

Das Fragment III wurde ebenfalls nach der Liquid-Phase-Synthese stufenweise aufgebaut. Als Schutzgruppen wurden wieder die Boc-Gruppe für die Blockierung der α-Aminofunktionen und die Benzylgruppe für den Schutz der Hydroxylgruppen am Serin und Threonin verwendet. Asparaginsäure wurde als t.-Butylester eingesetzt. (Siehe Syntheseschema S. 42) Die Kupplungen wurden fast alle mit durch DCCI voraktivierten Aminosäurederivaten in Methylenchlorid durchgeführt. Lediglich Boc-L-Asp(OtBu)-OH wurde wegen seiner aufwendigen Darstellung aus ökonomischen Gründen direkt mit DCCI gekuppelt. Die Umsätze wurden nach jedem Kupplungsschritt bzw. nach jeder Schutzgruppenabspaltung durch Titration kontrolliert. Während der Synthese zeigte es sich, daß die Boc-Schutzgruppe am Threonin in Position 5 nur sehr schwer abspaltbar war. Durch die übliche Abspaltung in 1,2 n HCl in Eisessig innerhalb 25 Minuten war die Schutzgruppe noch nicht vollständig abgespalten. Erst durch Verlängerung der Abspal-

tungsdauer auf 30 Minuten bzw. durch Wiederholung der Abspaltung konnte die Boc-Gruppe vollständig entfernt werden.

Zu einer Probehydrazinolyse vom Polyäthylenglykol wurde ein 30-facher Überschuß an Hydrazinhydrat, bezogen auf das am Träger gebundene Peptid, verwendet. Die Reaktionsdauer betrug zwei Stunden. Dabei stellte sich heraus, daß die Peptidbindung zwischen Asparaginsäure und Glycin durch das Hydrazin gespalten worden war. Die Aminosäureanalyse des Peptidhydrolysats direkt vom Träger ergab einen höheren Asparaginsäurewert als das Hydrolysat des abgespaltenen Peptids. Eine nach der Hydrazinolyse durchgeführte säulenchromatographische Trennung auf einer Sephadex LH 20 - Säule mit Methanol/Methylenchlorid 3:1 als Laufmittel und einer Tropfgeschwindigkeit von 35 ml/h zeigte zwei Peaks, die auf zwei Peptide schließen ließen. Die Aminosäureanalysen der beiden getrennten Fraktionen I und II zeigte, daß bei einem der beiden Peptide (Fraktion II) die N-terminale Asparaginsäure fehlte.

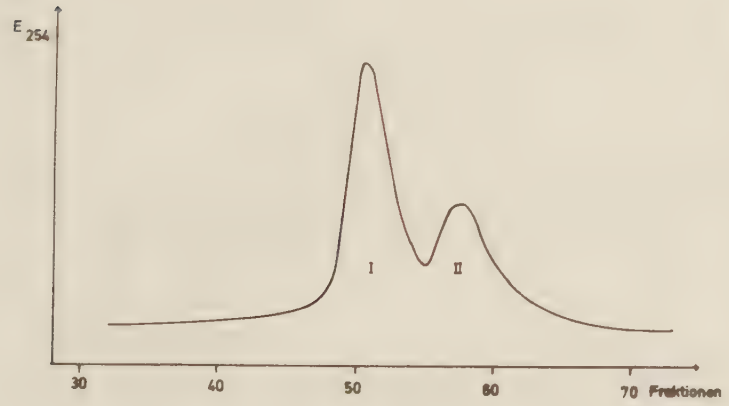
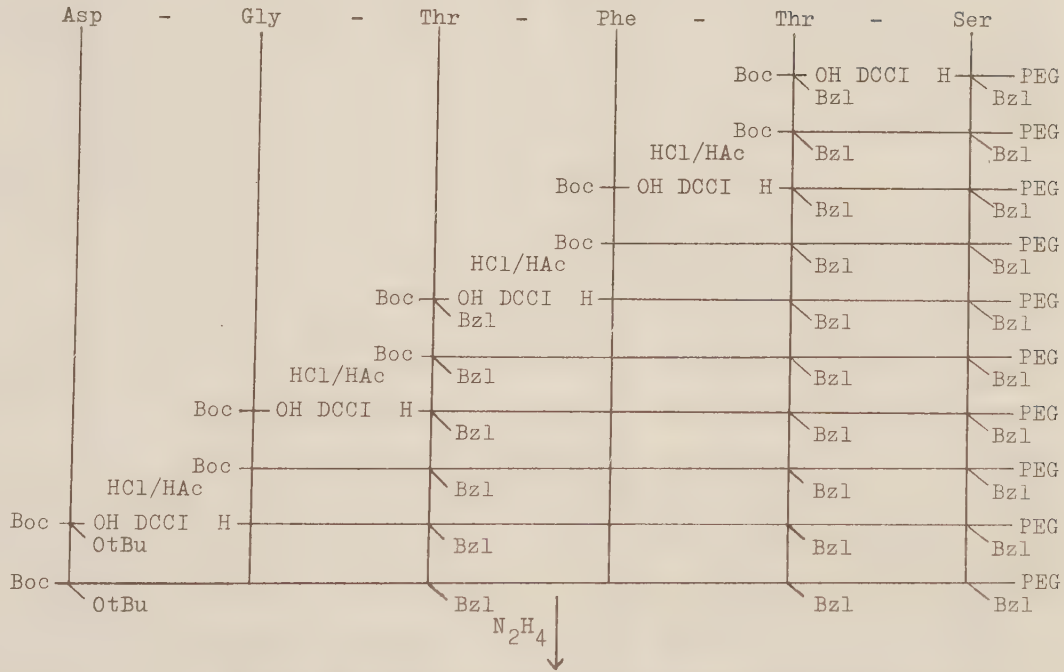


Abb. 9 : Elutionsdiagramm des Fragments III, 1.Abspaltung (Sephadex LH 20, Methanol/Methylenchlorid 3:1)

Syntheseschema zur Darstellung des Fragments III (Sequenz 3-8)



Bei der anschließend durchgeführten Hydrazinolyse wurde nur ein fünfzehnfacher Überschuß an Hydrazinhydrat verwendet, die Reaktionszeit jedoch bei 2 Stunden belassen. Die Hydrazidbildung wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Bei der so durchgeführten Hydrazinolyse konnte keine Spaltung der Peptidbindung zwischen Asparaginsäure und Glycin festgestellt werden. Das Peptid war chromatographisch einheitlich und die durch Aminosäureanalyse und Elementaranalyse ermittelten Werte entsprachen den berechneten Daten. Das Elutionsdiagramm auf einer 1 m langen Säule mit Sephadex LH 20 und einem Gemisch aus Methylenchlorid und Methanol 1:3 als Laufmittel zeigte einen einheitlichen Peak, der identisch war mit Peak I des ersten Hydrazinolyseversuchs.

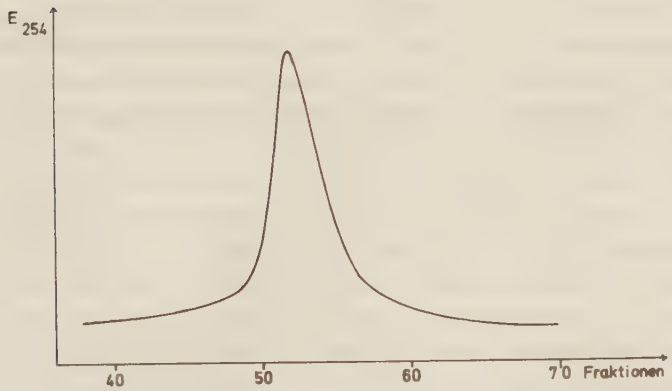


Abb. 10 : Elutionsdiagramm des Fragments III (2.Abspaltung) (Sephadex LH 20, Methanol/Methylenchlorid 3:1)

Klassische Synthese von Bis-adamantyloxycarbonyl-L-histidyl-benzylserylhydrazid (Bis-Adoc-L-His-Ser(Bzl)-N_2H_3

Fragment IV, Sequenz 1-2 des Secretins

Darstellung des Dipeptids Bis-Adoc-L-His-Ser(Bzl)-OMe

Zur Synthese des Dipeptids wurde O-Benzyl-L-Serinmethylesterhydrochlorid mit Bis-Adamantyloxycarbonyl-L-Histidin unter Zuhilfenahme von Dicyclohexylcarbodiimid auf klassische Weise gekuppelt.

Die Wahl geeigneter Schutzgruppen für Histidin ist in zweierlei Hinsicht nicht unproblematisch. Die Kupplungsausbeuten bei Kupplungen mit Histidin sind stark abhängig von den verwendeten Schutzgruppen. So fand E. Schaich bei Kupplungen in einer Merrifield-Synthese an ein Gly-Gly-Ala-Polystyrol bei fünffachen Überschüssen an Kupplungskomponente in DCCI-Kupplungen und einer Reaktionszeit von 3 Stunden für verschiedene Histidinderivate die folgenden, stark variierenden Kupplungsausbeuten (87).

Histidin-Derivat	Kupplungsausbeute %
Boc-His-OH	34
Bpoc-His(Boc)-OH	69
Z-His-OH	78
Boc-His(Dnp)-OH	83
Bpoc-His-OH	94
Z-His(Z)-OH	95
Boc-His(Bzl)-OH	101
Boc-His(Boc)-ONp	100
Adoc-His(Adoc)-OH	102

Daraus ist leicht ersichtlich, daß das oft verwendete Boc-Histidin neben seiner schlechten Löslichkeit auch

noch schlechte Kupplungsausbeuten liefert. Wegen der schwierigen Abspaltung der Benzylschutzgruppe am Imidazolstickstoff des Boc-His(Bzl)-OH mit Natrium in flüssigem Ammoniak ist auch dieses gebräuchliche Histidinderivat nicht gerade empfehlenswert. Die Darstellung des Bis-Boc-Histidins, das von der Kupplungsausbeute her empfehlenswert wäre, nach Schnabel (88), (89) stößt infolge des zur Synthese benötigten und im Labor nur schwer zugänglichen Butyloxycarbonylfluorids auf größere Schwierigkeiten. Zwei einfachere Synthesen von Boc-His(Boc)-ONp beschreibt E. Schaich (87) einerseits aus Boc-Azid und Histidin-p-nitrophenylester und andererseits aus dem instabilen t.-Butyloxycarbonylchlorid und Histidin. Leicht zugänglich und in seinen Eigenschaften weitgehend mit dem Bis-Boc-Histidin identisch ist das Bis-Adoc-histidin. Dieses Derivat führt auch zu guten Kupplungsausbeuten. (53)

Die Stabilität der Imidazolschutzgruppen am Histidin während der Synthese ist ebenfalls sehr unterschiedlich. Unter sauren Bedingungen werden sowohl die Boc- als auch die Adoc-Schutzgruppe vollständig abgespalten, weshalb die betreffenden Derivate eigentlich nur für N-terminales Histidin geeignet sind. Dies ist beim Secretin der Fall. Vollständig stabil in saurer Lösung wären die Benzyl- und die Benzyloxycarbonylgruppe. Der Benzylrest wäre auch unter alkalischen Bedingungen stabil, was aber während der Synthese weniger von Bedeutung ist, da alkalische Bedingungen während der Kupplungszyklen vermieden werden können und höchstens während der Abspaltung von einem Träger in alkalischem Medium gearbeitet wird.

Aus diesen Überlegungen heraus wurde in der vorliegenden Synthese des N-terminalen Fragments IV das Bis-Adoc-L-histidin mit Erfolg verwendet. Das in guten Ausbeuten erhaltene Dipeptid Bis-Adoc-L-His-Ser(Bzl)-OMe war dünnschichtchromatographisch einheitlich und die bei der Aminosäureanalyse erhaltenen Werte stimmten mit

den berechneten Werten überein. Abb. 12 zeigt das ^{13}C-NMR-Spektrum dieser Verbindung.

Darstellung von Bis-Adoc-L-His-Ser(Bzl)-N_2H_3

Die Hydrazinolyse des Dipeptidmethylesters mit Hilfe eines siebenfachen Überschusses an Hydrazinhydrat und einer Reaktionsdauer von 4 Stunden ergab ein schlecht kristallisierendes Produkt, das dünnschichtchromatographisch nicht einheitlich war und durch Chromatographie über eine Sephadex LH 20 - Säule mit absolutem Methanol als Laufmittel gereinigt werden mußte. Das gereinigte Produkt war chromatographisch einheitlich und zeigte eine gute Elementaranalyse und Aminosäureanalyse.

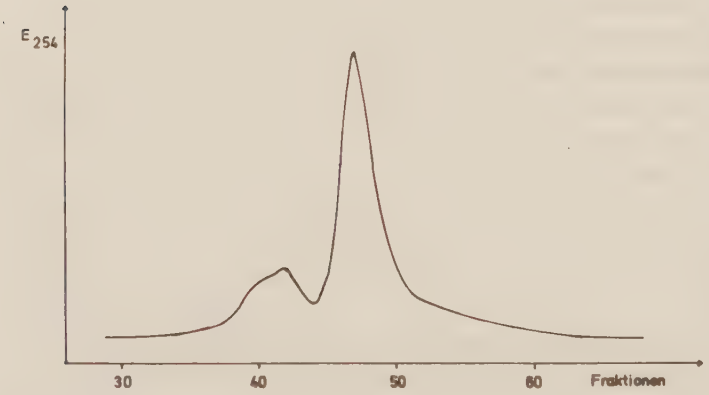


Abb. 11 : Elutionsdiagramm von Adoc-L-His(Adoc)-Ser(Bzl)-N_2H_3,(Sephadex LH 20, Methanol)

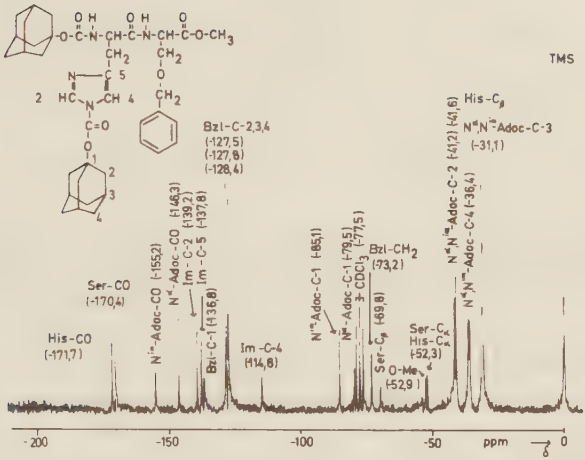


Abb. 12 : PFT-^{13}C-NMR-Spektrum von Adoc-L-His(Adoc)-Ser(Bzl)-OMe

Geräte

Folgende Geräte und Instrumente wurden verwendet:

Schmelzpunktsapparat nach Dr. Tottoli der Firma Büchi, Flawil
Zeiss-Digital-Polarimeter OLD 5
Aminosäureanalysator Beckmann Unichrom
Fraktionssammler mit optischer Einheit UA 5 der Firma ISCO
Mikrodosimat mit pH-Meter E 512, Impulsomat E 473 und Glaselektrode EA 121 der Firma Metrohm, Herisau
Mikroglaselektrode der Firma Schott, Mainz
IR-Spektrograph Infracord der Firma Perkin-Elmer
NMR-Spektrometer Bruker HFX 90
Dünnschichtelektrophoreseapparatur der Firma Camag

Chemikalien

Die verwendeten L-Aminosäuren wurden von der Firma Merck, Darmstadt, geliefert.
Polyäthylenglykol wurde von der Firma Roth, Karlsruhe, bezogen.
Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-Fertigplatten 60 F_{254} der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

Folgende Laufmittelsysteme wurden benützt:

I n-Butanol/Eisessig/Wasser 2:1:1
II Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser 60:45:6:14
III n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24
IV Äthanol/Wasser/Benzol/Eisessig 40:20:10:5
V n-Butanol/Eisessig/Wasser 3:1:1
VI Methyläthylketon/Eisessig/Wasser/Pyridin 7:1:2:3
VII Chloroform/Methanol 1:1

Lösungsmittel und Reagenzien

Die zur Synthese benötigten Lösungsmittel wurden kurz vor Gebrauch absolutiert und gereinigt.

CH_2Cl_2 wurde über P_2O_5 getrocknet und über K_2CO_3 destilliert.

Essigsäure wurde bei Normaldruck über P_2O_5 destilliert.

DMF wurde vor Gebrauch durch azeotrope Destillation im Vakuum und unter Lichtausschluß gereinigt. (250 g DMF, 30 g Benzol, 12 g Wasser)

Äther wurde mit Natrium-Suspension in Paraffin absolutiert (Indikator Benzophenon) und destilliert.

Äthanol und Methanol wurden über $CaCl_2$ vorgetrocknet und mit Magnesium absolutiert und destilliert.

Essigester wurde über P_2O_5 destilliert.

Petroläther wurde über Schwefelsäure destilliert.

Triäthylamin und N-Methylmorpholin wurden durch fraktionierte Destillation gereinigt.

DCCI wurde im Hochvakuum über eine kleine Vigreux-Kolonne destilliert.

III. EXPERIMENTELLER TEIL

A. Darstellung der benötigten Aminosäurederivate

1) Darstellung von t.-Butyloxycarbonylazid (Boc-N_3)

Eine Lösung von 400 g (3,3 Mol) Carbazinsäure-t.-butylester (Boc-N_2H_3) in 352 g Eisessig und 500 ml Wasser wurde in einem Eisbad gekühlt. Zu dieser Lösung wurden 229,6 g (3,33 Mol) festes $NaNO_2$ innerhalb 60 Minuten so zugesetzt, daß die Temperatur bei 5 - 10° C blieb. Dann wurde die Mischung weitere 30 Minuten gerührt. Anschließend wurde 500 ml Wasser zugesetzt, die goldgelbe Azidschicht abgetrennt und die wässrige Phase vier Mal mit Äther extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit je 150 ml Wasser, dreimal mit je 150 ml 1 N $NaHCO_3$-Lösung und dann wieder mit Wasser gewaschen. Dann wurde über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und am Rotationsverdampfer bei 40 - 45° C im Wasserstrahlvakuum destilliert.

Ausbeute: 370 g
Sdp. : ca. 40° C (13 Torr) Lit.: Sdp. : 36,5 -37,5° C (90) (bei 10 Torr)

2) Darstellung von Benzyloxycarbonylchlorid (Z-Cl)

Zu 1,5 kg (13,9 Mol) frisch destilliertem Benzylalkohol wurden bei - 10 bis - 30° C unter starkem Rühren ca. 1,5 kg (15,2 Mol) Phosgen eingeleitet. Dabei ist zu beachten, daß die Reaktionsmischung nicht fest wird. Dann wurde die Lösung langsam auf Zimmertemperatur gebracht und 24 Stunden lang Stickstoff eingeleitet, um die entstandene HCl und überschüssiges Phosgen zu entfernen. Die restliche HCl wurde durch einstündiges Evakuieren an der Wasserstrahlpumpe entfernt. Anschließend wurde über Na_2SO_4 gut getrocknet. Eine Destillation des Produktes war auch im Hochvakuum nicht möglich, da sich der größte Teil des

Z-Cl dabei zersetzte.

Ausbeute : 2,35 kg (quantitativ) (91)

3) Darstellung von Adamantyloxycarbonylchlorid (Adoc-Cl)

Zu einer Lösung von 60 g (0,61 Mol) flüssigem Phosgen in 200 ml wasserfreiem Benzol wurde eine Lösung von 16 g (0,1 Mol) 1-Hydroxyadamantan und 14 g (0,18 Mol) Pyridin in 400 ml Benzol tropfenweise unter Rühren innerhalb einer Stunde bei 4° C zugegeben. Als ein weißer Niederschlag ausfiel wurden weitere 200 ml Benzol zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde eine Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen, dann abfiltriert. Das Filtrat wurde in Eiswasser gegossen. Dann wurde die organische Schicht abgetrennt und über Na_2SO_4 getrocknet und abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde abgezogen und der Rückstand zweimal in Cyclohexan aufgenommen und dann das Cyclohexan jeweils wieder zur Trockene abgezogen. Man erhielt so weiße, nadelförmige Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 40 - 42° C. Dieses Rohprodukt kann direkt weiterverarbeitet werden. (53)

Kritallisiert man eine Probe in wasserfreiem Petroläther 30 - 50 um, erhält man weiße Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 46 - 47 $^{\circ}$ C.

Ausbeute : 22 g Rohprodukt (98 %)
Elementaranalyse :
ber.: 61,54 % C, 7,04 % H, 16,51 % Cl
gef.: 61,42 % C, 7,07 % H, 16,41 % Cl

4) Darstellung der Boc-L-Aminosäuren

Die Darstellung der Boc-L-Aminosäurederivate (vgl. Tab. Seite 52) erfolgte nach der pH-Stat-Methode von Schnabel (92)

Tabelle zur Darstellung der Boc-L-Aminosäurederivate nach Schnabel

Amino-säure	pH-Wert	Reakt.-zeit (h)	Umkr.	Aus-beute	Smp. °C	R_f-Werte	Lauf-mittel	$[\alpha]_{578}^{20}$ c=1	Elementaranalysen oben ber., darunter gef. % C	% H	% N
Ala	10,3	12	EE/PÄ	86 %	80 - 81	0,74	IV	-25,5 (HAc)	50,78	7,99	7,40
						0,64	V		50,69	8,15	7,47
Gln	10,5	30	EE	68 %	116-118	0,74	II	-3,1 (EtOH)	48,76	7,37	11,37
						0,72	IV		48,77	7,50	11,34
						0,52	V				
Gly	10,2	6	Methyl-äthylke-ton	92 %	92	0,59	III	---	47,99	7,48	8,00
						0,60	V		47,78	7,52	8,08
Leu*	10,1	30	EE/PÄ	72 %	81-83	0,68	III	-28 (HAc)	53,00	9,30	5,62
						0,69	V		52,93	9,12	5,61
Orn(Z)**	10,4	32		83 %	94-96	0,75	III	-3,1 (HAc)	58,99	7,15	7,64
						0,67	V		58,95	7,15	7,63
Phe	10,2	22	Ä/PÄ	71 %	82-84	0,65	III	-4,0 (HAc)	63,38	7,22	5,28
						0,66	V		63,24	7,16	5,36
Ser(Bzl)	9,4	15	EE/PÄ	80 %	58-60	0,68	III	+20,8 (80 %	61,01	7,17	4,74
						0,80	IV	ETOH)	60,97	7,24	4,69
						0,66	V				
						0,56	VI				

Amino-säure	pH-Wert	Reakt.-zeit(h)	Umkr.	Aus beute	Smp. °C	R_f-Werte	Laufmittel	$[\alpha]_{578}$ c=1	Elementaranalyse oben ber., darunter gef. % C	% H	% N
Ser*	9,5	24	Ä/PÄ	53 %	52-54	0,61	I	-4,6(HAc)	43,05	7,62	6,28
						0,77	II		43,09	7,57	6,29
						0,58	III				
						0,85	IV				
						0,81	VI				
Thr(Bzl)	9,5	5,5	Cyclohe-xan	75 %	115-116	0,77	II	+16,5(MeOH)	62,12	7,49	4,53
						0,71	III		61,93	7,48	4,52
						0,73	V				
Val	9,5	24	EE/PÄ	64 %	77-79	0,69	I	-6,7 (HAc)	55,27	8,81	6,45
						0,62	III		55,24	8,82	6,25
						0,74	IV				
						0,65	V				

*Die Angaben über Boc-L-Leu und Boc-L-Ser beziehen sich jeweils auf das Monohydrat, da die wasserfreien Derivate nicht kristallisieren.

**Der für Boc-Orn(Z) gefundene Drehwert stimmt nicht mit dem in der Literatur erwähnten Wert überein. Lit.: $[\alpha]_{578}^{20} = -8,9$ (92). Jedoch konnte durch Abspaltung der Schutzgruppen und anschließende Drehwertmessung gezeigt werden, daß keine Racemisierung aufgetreten ist und somit der von E. Schnabel angegebene Wert falsch ist. Da in der Literatur nur ein öliges Produkt erhalten wurde und hier ein kristallines Produkt gewonnen werden konnte, kann der Fehler auf diesem Unterschied beruhen. Die richtige Struktur konnte durch ^{1}H- und ^{13}C-NMR und durch IR-Spektren bewiesen werden.

0,5 Mol der L-Aminosäure wurden in 150-200 ml Dioxan/Wasser (1:1) suspendiert und mit einem zehnprozentigen Überschuß von Boc-N_3 versetzt. Dann wurde bei einem pH von 9-11 (je nach Aminosäure, siehe Tabelle S. 52) mit 4 n NaOH titriert. Die Reaktionszeit betrug 5-30 Stunden. Dann wurde die Lösung mit Äther extrahiert, um überschüssiges Boc-N_3 zu entfernen. Anschließend wurde die Reaktionsmischung neutralisiert und das Dioxan am Rotationsverdampfer weitgehend abgezogen. Dann wurde mit 1 N HCl oder mit Zitronensäure unter Eiskühlung auf pH 2-3 angesäuert. Die ausgefallene Boc-Aminosäure wurde mit Essigester extrahiert, die vereinigten Extrakte mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Dann wurde vom Trockenmittel abfiltriert, die Lösung eingeengt und durch Zugabe von Petroläther die Boc-Aminosäure auskristallisiert.

t.-Butyloxycarbonyl-L-Glutamin-p-nitrophenylester

(Boc-L-Gln-ONp)

73,89 g (0,3 Mol) Boc-L-Gln und 54,2 g (0,39 Mol) p-Nitrophenol wurden in 450 ml Essigester gelöst, auf 0° C gekühlt und mit einer Lösung von 55,2 g (0,3 Mol) DCCI in 50 ml Essigester versetzt. Nach 30 Minuten bei 0° C wurde noch eine Stunde bei Zimmertemperatur gerührt, dann wurde der gebildete Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, die organische Phase mehrmals mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert, das Lösungsmittel abgezogen und aus Essigester/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute 36 g (33 %)

Smp.: 145-146° C Lit.: 147-148° C (93)

R_f = 0,72 (n-Butanol/Eisessig/Wasser 3:1:1)

$[\alpha]_{578}^{20}$ = -39° Lit.: $[\alpha]_D^{25}$ = -41° (93)

Elementaranalyse ber.: 53,33 % C, 5,72 % H, 11,44 % N

gef.: 53,49 % C, 5,76 % H, 11,44 % N

t.-Butyloxycarbonylglycin-p-nitrophenylester (Boc-Gly-ONp)

35 g (0,2 Mol) Boc-Glycin und 36,4 g (0,2 Mol) p-Nitrophenol wurden in 300 ml Essigester gelöst, auf 0° C gekühlt und mit 41,2 g (0,2 Mol) in 50 ml Essigester gelöstem DCCI versetzt. Die Mischung wurde 30 Minuten bei 0° C und anschließend eine Stunde bei Zimmertemperatur gerührt. Der entstandene Harnstoff wurde abfiltriert und aus dem Filtrat das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach zweimaligem Umfällen des Rückstandes aus Äther/Petroläther wurden dicke, fast völlig farblose Nadeln erhalten.

Ausbeute 51 g (86 %)
Smp.: 69° C Lit.: 70-71°C (94)
R_f-Werte: 0,85 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)
0,81 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)
0,96 (Methyläthylketon/HAc/H_2O/Pyridin 7:1:2:3)
Elementaranalyse ber.: 52,70 % C, 5,44 % H, 9,44 % N
gef.: 52,93 % C, 5,45 % H, 9,32 % N

δ-Benzyloxycarbonyl-L-ornithin (H-L-Orn(Z)-OH)

50 g (0,296 Mol) L-Ornithin-hydrochlorid wurden in 600 ml Wasser aufgeschlämmt und bei 100° C mit $CuCO_3 \cdot Cu(OH)_2$ gesättigt. Dann wurde im Eisbad abgekühlt und das überschüssige basische Kupfercarbonat abfiltriert. Zu der blauen Lösung wurden bei 0° C innerhalb 20 Minuten 360 ml 2 N NaOH und 56,2 g (0,33 Mol) Z-Cl in 6 Portionen zugegeben. Dann wurde noch eine halbe Stunde gerührt und abfiltriert.

Aufarbeitung a) Der entstandene Niederschlag wurde in 1,5 l Wasser suspendiert und in die Suspension 5 Stunden lang H_2S eingeleitet. Dann wurden 6 l Wasser zugegeben, einige Minuten gekocht und dann das CuS heiß abfiltriert. Beim Abkühlen fiel das H-L-Orn(Z)-OH aus (82)

Aufarbeitung b) Zu dem Niederschlag wurden 250 g Titriplex III gegeben und die Mischung in einem Liter Wasser

suspendiert. Dann wurde konzentrierte HCl zugegeben, bis alles in Lösung gegangen war. Von geringen Spuren Ungelöstem wurde abfiltriert und unter sehr starkem Rühren mit konzentrierter NaOH neutralisiert. Dabei fiel das Produkt aus (95)

Ausbeute nach Aufarbeitung a) 38,6 g (49 %)
nach Aufarbeitung b) 68,2 g (87 %)

Smp.: 258-260° C Lit.: 253-255° C (96)

R_f-Werte: 0,34 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,74 ($CHCl_3$/MeOH/HAc/H_2O 60:45:6:24)
0,52 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)
0,81 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)
0,54 (Methyläthylketon/HAc/H_2O/Pyridin 7:1:2:3)

Elementaranalyse ber.: 58,63 % C, 6,81 % H, 10,52 % N
gef.: 58,61 % C, 6,83 % H, 10,60 % N

Boc-L-Orn(Z)-OH·DCHA

29,3 g (0,08 Mol) Boc-L-Orn(Z)-OH in 80 ml absolutem Äther wurden mit 14,5 g (0,08 Mol) Dicyclohexylamin (DCHA) versetzt. Das Produkt kristallisierte im Exsikkator über P_2O_5 aus.

Ausbeute 41 g (quantitativ)

Smp.: 109-111°C

R_f-Werte: 0,68 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)
0,78 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)

Elementaranalyse ber.: 65,78 % C, 9,02 % H, 7,67 % N
gef.: 65,68 % C, 8,89 % H, 7,68 % N

Aus diesem Produkt konnte nach Zerstörung des DCHA-Salzes in verdünnter Schwefelsäure etwas kristallines Boc-L-Orn(Z)-OH gewonnen werden. Mit Hilfe dieser Impfkristalle kannte dann kristallines Boc-L-Orn(Z)-OH direkt aus dem Öl erhalten werden. (Daten siehe Tabelle S. 52) Kristallines Boc-L-Orn(Z)-OH war bislang noch nicht in der Literatur beschrieben.

Rückstand wurde mit Äther verrieben und abfiltriert. Das Gemisch aus O-Benzyl-DL-Serin und NH_4Br wurde in siedendem Wasser gelöst. Beim Abkühlen fiel das O-Benzyl-DL-Serin kristallin aus. Es wurde aus siedendem Wasser umkristallisiert.

Ausbeute 180 g (47 %)
Smp.: 218-219° C (Lit.: 218° C) (97)
Elementaranalyse ber.: 61,53 % C, 6,71 % H, 7,18 % N
gef.: 61,56 % C, 6,82 % H, 7,11 % N

c) N-Acetyl-O-Benzyl-DL-Serin

90 ml Acetanhydrid und 570 ml 2 N NaOH wurden gleichzeitig zu einer gekühlten Lösung von 115 g (0,58 Mol) O-Benzyl-DL-Serin in 290 ml (0,58 Mol) 2 N NaOH gegeben und die Reaktionsmischung wurde sofort mit 1 N HCl auf pH 2 gestellt. Dabei fiel das N-Acetyl-O-Benzyl-DL-Serin kristallin aus. Es wurde abgesaugt und mit kaltem Wasser gewaschen. Umkristallisiert wurde aus heißem Wasser.

Ausbeute 89 g (65 %)
Smp.: 137-138° C Lit.: 139-140° C (98)
R_f-Werte: 0,69 (Methyläthylketon/HAc/H_2O/Pyridin 7:1:2:3)
0,55 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)
0,83 ($CHCl_3$/MeOH/HAc/H_2O 60:45:6:14)
Elementaranalyse ber.: 60,75 % C, 6,37 % H, 5,90 % N
gef.: 60,67 % C, 6,18 % H, 5,99 % N

d) O-Benzyl-L-Serin (H-L-Ser(Bzl)-OH)

Darstellung der benötigten Nierenacylase (99)

1 kg tiefgefrorene, frische Schweinenieren wurden mit Wasser aufgetaut, in kleine Stücke geschnitten, vom Fett befreit und mit 1,5 l Eiswasser homogenisiert und 5 Minuten bei 7000 Upm und -5° C zentrifugiert. Die überstehende, trübe Lösung wurde im Eisbad auf 0° C gekühlt und mit 2 N HCl auf pH 4,7 bis 5,0 gebracht. Dann wurde sofort bei 10 000 Upm zentrifugiert. Das dunkelrote Zentrifugat wurde in ein im Eisbad stehendes Becherglas ge

geben und mit 2 N NaOH auf pH 6,5 gebracht. Die Lösung wurde auf -30° C gekühlt und pro Liter mit 266 g $(NH_4)_2SO_4$ innerhalb 20 Minuten versetzt. Dabei sinkt die Temperatur auf -3° C ab. Nach 30 Minuten wurde 5 Minuten lang bei 10 000 Upm zentrifugiert, der Rückstand in 40 ml Eiswasser suspendiert und weitere 10 Minuten bei 10 000 Upm zentrifugiert. Die dunkelrote Flüüsigkeit wurde über Nacht gegen Leitungswasser dialysiert. Dann wurde vom ausgefallenen Protein 5 Minuten bei 7000 Upm zentrifugiert und die rotbraune Lösung mit stark verdünnter Essigsäure (1 ml Essigsäure auf 500 ml H_2O) auf pH 6 gebracht. Dann wurde auf -2° C abgekühlt und tropfenweise 0,2 Vol. Aceton, bezogen auf das Ausgangsvolumen, zugegeben, auf -5° C abgekühlt und noch einmal die gleiche Menge Aceton zugegeben. Dann wurde 5 Minuten bei 7000 Upm zentrifugiert. (Zentrifuge -10° C) Die strohgelbe Lösung wurde auf -5 bis -10° C abgekühlt und mit 0,6 Vol. Aceton, bezogen auf die Ausgangsmenge, tropfenweise versetzt. Anschließend wurde 5 Minuten bei 7000 Upm zentrifugiert und der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und sofort gefriergetrocknet.
Ausbeute 0,8 g

Racemattrennung

Zur Racematspaltung wurden 25 g (0,105 Mol) N-Acetyl-O-Benzyl-DL-Serin in 1 l bidestilliertem Wasser mit konz. NH_3 in Lösung gebracht und mit HCl auf pH 7,2 eingestellt. Nach Zugabe von 720 mg Nierenacylase I wurde bei 37° C 24 Stunden lang gerührt und dann der pH nachgestellt. Dann wurde weitere 2 Tage gerührt und dann aufgearbeitet. (100) Hierzu wurde mit Essigsäure auf pH 4,5 gebracht, mit Aktivkohle gerührt und filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum eingeengt, wobei das O-Benzyl-L-Serin in seidig glänzenden Blättchen auskristallisierte. Umkristallisiert wurde aus heißem Wasser.
Ausbeute: 7,2 g (70 %)

Smp.: 213-214° C Lit.: 213° C (101)
R_f-Werte: 0,37 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,70 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)
0,81 ($CHCl_3$/MeOH/HAc/H_2O 60:45:6:14)
$[\alpha]_D^{20}$ = + 22,8 Lit: $[\alpha]_{546}^{20}$ = + 26,9 (c=1, 80 % HAc + 1 Äquiv. HCl)
Elementaranalyse ber.: 61,53 % C, 6,71 % H, 7,18 % N
gef.: 61,47 % C, 6,85 % H, 7,18 % N

Boc-L-Ser(Bzl)-OH
Darstellung nach Schnabel, siehe Tabelle S.

N-t.-Butyloxycarbonyl-O-Benzyl-L-Serin-DCHA-Salz

Boc-L-Ser(Bzl)-OH·DCHA

Da Boc-L-Ser(Bzl)-OH sehr schlecht spontan kristallisiert, wurde das leicht kristallisierende DCHA-Salz dargestellt um das Produkt zu reinigen.
Das aus 5 g O-Benzyl-L-Serin erhaltene Öl von Boc-L-Ser (Bzl)-OH wurde in etwas Äther aufgenommen und 4,2 ml Dicyclohexylamin zugegeben. Bei Zugabe von Petroläther kristallisierte das Produkt sofort aus.
Ausbeute 8 g (99 %)
Elementaranalyse ber.: 68,03 % C, 9,30 % H, 5,88 % N
gef.: 68,12 % C, 9,21 % H, 5,85 % N
Das nach der Zerlegung des DCHA-Salzes mit verdünnter Schwefelsäure gewonnene Boc-L-Ser(Bzl)-OH konnte aus Essigester und Petroläther kristallin erhalten werden. Mit Hilfe von solchen Impfkristallen konnte dann bei späteren Darstellungen das Produkt direkt, d.h. ohne Zwischenreinigung über das DCHA-Salz kristallin erhalten werden, indem das Reaktionsprodukt in wenig Essigester aufgenommen, mit Petroläther bis zur Trübung versetzt, mit Impfkristallen versehen und in der Kälte gerührt wurde.

Darstellung von N-t.-Butyloxycarbonyl-O-Benzyl-L-Threonin (Boc-L-Thr(Bzl)-OH

a) O-Benzyl-L-Threoninbenzylester-hemioxalat

Eine Mischung von 500 ml Benzylalkohol, 1000 ml Toluol, 59,5 g (0,5 Mol) L-Threonin und 123,5 g p-Toluolsulfonsäuremonohydrat wurde an einem Wasserabscheider so lange gekocht, bis alles Wasser abgeschieden war. (ca. 20 Stunden) Dann wurde die Mischung abgekühlt, verdünnt mit 750 ml Essigester und so lange mit kalter 0,5 N Na_2CO_3-Lösung gewaschen, bis die wässrige Phase einen pH von 9 aufwies. Die organische Phase wurde abgetrennt und einmal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen und das Waschwasser wurden einmal mit 200 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und mit einer Lösung von 60 g (0,55 Mol) Oxalsäuredihydrat in 300 ml Methanol versetzt. Die Mischung wurde mehrere Stunden gekühlt, dann das Hemioxalat-Salz abfiltriert und mit kaltem Äthanol gewaschen. Umkristallisiert wurde aus heißem Äthanol.

Ausbeute 43 g (22%)

Smp.: 167-168° C Lit.: 165-167° C (102)

R_f-Werte: 0,82 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)
0,87 (Methyläthylketon/HAc/H_2O/Pyridin 7:1:2:3)
0,60 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)

Elementaranalyse ber.: 61,69 % C, 5,95 % H, 3,60 % N
gef.: 61,58 % C, 6,14 % H, 3,58 % N

O-Benzyl-N-t.-Butyloxycarbonyl-L-Threonin (Boc-L-Thr(Bzl)-OH)

Zu einer kalt gerührten Mischung von 30 g (0,085 Mol) O-Benzyl-Threoninbenzylesterhemioxalat in 250 ml Methanol wurde allmählich eine Lösung von 12,5 g NaOH in 75 ml Wasser gegeben. Dann wurde noch eine Stunde bei

Zimmertemperatur gerührt, anschließend eine Lösung von 11 g $NaHCO_3$ in 100 ml Wasser und 27 ml (0,2 Mol) Boc-N_3 in 250 ml Dioxan zugegeben. Dann wurde 22 Stunden bei 45° C gerührt, danach das Dioxan am Rotationsverdampfer abgezogen, mit Wasser verdünnt und mit Äther extrahiert, um überschüssiges Boc-N_3 und nicht verseiften Ester zu entfernen. Die wässrige Phase wurde gekühlt, mit fester Zitronensäure auf pH 3 angesäuert und dreimal mit Essigester extrahiert. Dann wurde über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und der Essigester abgezogen. Es blieben 11,5 g Öl, aus dem das Produkt in der Kälte auskristallisierte. Umkristallisiert wurde aus Cyclohexan oder aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute 8,5 g (32 %)

Smp.: 113-115° C Lit.: 115-116° C (102)

$[\alpha]_{578}^{20}$ = +16,5 Lit.: $[\alpha]_D^{20}$ = +15,9 (c=1,MeOH)

R_f-Werte: 0,73 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)

0,77 ($CHCl_3$/MeOH/HAc 85:10:5)

0,71 (n-Butanol/Pyridin/HAc/H_2O 30:20:6:24)

Elementaranalyse ber.: 62,12 % C, 7,49 % H, 4,53 % N

gef.: 61,93 % C, 7,48 % H, 4,57 % N

O-Benzyl-L-Threonin (H-L-Thr(Bzl)-OH)

7,8 g (0,02 Mol) O-Benzyl-L-threoninbenzylester-hemioxalat wurden durch Verteilung zwischen 1 M K_2CO_3 und Essigester in die freie Base verwandelt. Die Essigesterphase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer abgezogen. Das übrigbleibende Öl wurde in 100 ml Methanol gelöst und mit 24 ml 1 N NaOH versetzt. Die Lösung wurde 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann eingeengt und die Aminosäure durch Chromatographie auf einer kurzen Säule mit Dowex 1 X 8 -Ionenaustauscher durch Absorption an die freie Base des Harzes und Elution mit 1 N Essigsäure isoliert.

Ausbeute 2,8 g (68 %)

Smp.: 196-197° C Lit.: 197° C (102)

$[\alpha]_{578}^{20}$ = -30,8° (c=1,HAc) Lit.: $[\alpha]_D^{25}$ = -30,4 (c=1,1, HAc)

R_f-Werte: 0,37 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,83 ($CHCl_3$/MeOH/HAc/H_2O 60:45:6:14)
0,60 (Methyläthylketon/HAc/H_2O/Pyridin 7:1:2:3)
Elementaranalyse ber.: 63,12 % C, 7,22 % H, 6,69 % N
gef.: 63,31 % C, 7,54 % H, 6,53 % N

Darstellung von t.-Butyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-β-t.-butylester (Boc-L-Asp(OtBu)-OH

a) N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure (Z-L-Asp(OH)-OH)

199,5 g (1,5 Mol) L-Asparaginsäure wurden in 225 ml Wasser suspendiert und vorsichtig 253,5 g (3 Mol) $NaHCO_3$ portionsweise zugegeben. Zu dieser Suspension wurden bei 1-2° C 255 g (1,5 Mol) Z-Cl und gleichzeitig 2 N NaOH zugetropft. Nach beendeter Z-Cl-Zugabe wurde auf pH 9 eingestellt. Das Zutropfen von insgesamt 2,4 l 2 N NaOH am pH-Stat war nach ca. 5 Stunden beendet. Hierauf wurde mit 2 N H_2SO_4 auf pH 2 gestellt, dreimal mit je 300 ml Essigester extrahiert und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Abziehen des Essigesters fiel das Endprodukt im Kühlschrank kristallin an. Es wurde aus Essigester/Petroläther umkristallisiert.
Ausbeute 244 g (61 %)
Smp.: 108-110° C Lit.: 114-116° C (103), (104)
$[\alpha]_{578}^{20}$ = + 9,6° (c=1, HAc) Lit.: $[\alpha]_D^{20}$ = +9,5° (c=2,HAc)
R_f-Werte: 0,52 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,92 ($CHCl_3$/MeOH/HAc/H_2O 60:45:6:14)
0,82 (Methyläthylketon/HAc/H_2O/Pyridin 7:1:2:3)
Elementaranalyse ber.: 53,94 % C, 4,90 % H, 5,24 % N
gef.: 53,70 % C, 5,00 % H, 5,28 % N

b) Z-L-Asparaginsäureanhydrid

235 g (0,88 Mol) Z-L-Asp(OH)-OH wurden in 400 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und bei 0° C mit 200 g

(0,97 Mol) DCCI, gelöst in 400 ml absolutem Tetrahydrofuran versetzt. Nach sechzehnstündigem Stehen bei -23° C wurde vom ausgefallenen Harnstoff abgesaugt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Dann wurde in 500 ml Chloroform gelöst und durch Zugabe von 1 l absolutem Äther auskristallisiert.

Ausbeute 200 g (91 %)

Smp.: 104-105° C Lit.: 109-110° C (105)

$[\alpha]_D^{20}$ = -37,5° (c=2, HAc) Lit.: $[\alpha]_D^{20}$ = -37,9° (c= 2, HAc)

R_f-Werte: 0,55 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,47 (n-Butanol/Pyridin/HAc/H_2O 30:20:6:24)
0,75 (Methyläthylketon/HAc/H_2O/Pyridin 7:1:2:3)

Elementaranalyse ber.: 57,84 % C, 4,45 % H, 5,62 % N
gef.: 57,68 % C, 4,52 % H, 5,58 % N

c) N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-(α,β)-monoäthylester-DCHA-Salz

193 g (0,77 Mol) Z-L-Asparaginsäureanhydrid wurden in 1 l absolutem Äthanol gelöst und 16 Stunden unter Rückfluß gekocht. Dabei entstand α- und β-Ester im Verhältnis 1:1. Das überschüssige Äthanol wurde abgezogen und der ölige Rückstand in 250 ml Äther gelöst. Hierauf wurde mit 159,8 g (0,77 Mol) Dicyclohexylamin versetzt und zwei Tage im Kühlschrank auskristallisiert. Dann wurde abgesaugt und aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert. Da der α-Ester bereits nach 4 - 6 Stunden, der β-Ester hingegen erst nach 12 - 24 Stunden auskristallisiert, wurden die beiden Ester durch fraktionierte Kristallisation getrennt.

Ausbeute 51 g (28 %)

Smp.: 150-151° C Lit.: 150-152° C (103)

Elementaranalyse ber.: 65,52 % C, 8,46 % H, 5,88 % N
gef.: 65,41 % C, 8,28 % H, 5,79 % N

d) Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-α-äthylester

(Z-L-Asp(OH)-OEt)

51 g (0,105 Mol) DCHA-Salz des α-Esters wurden in 2 N H_2SO_4 suspendiert und der freigesetzte α-Ester in Äther aufgenommen. Die Lösung wurde mit Wasser sulfatfrei gewaschen, getrocknet und das Produkt aus Äther/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute 24 g (77,5 %)

Smp.: 83-84° C Lit.: 83-84° C (103)

$[\alpha]_D^{20}$ = -14,5° (c=2, EtOH) Lit.: $[\alpha]_D^{20}$ = -14,3° (c=2, EtOH)

R_f-Werte: 0,76 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,61 (n-Butanol/Pyridin/HAc/H_2O 30:20:6:24)
0,96 (Methyläthylketon/HAc/H_2O/Pyridin 7:1:2:3)

Elementaranalyse ber.: 56,94 % C, 5,80 % H, 4,74 % N
gef.: 56,69 % C, 5,80 % H, 4,74 % N

e) Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-α-äthyl-β-t.butylester (Z-L-Asp(OtBu)-OEt)

Zu einer Lösung von 24 g (0,081 Mol) Z-L-Asp(OH)-OEt in 200 ml absolutem CH_2Cl_2 wurde bei -5° C 1 ml konzentrierte H_2SO_4 gegeben und ca 100 ml Isobutylen eingeleitet. Dann wurde die Mischung in einem geschlossenen Gefäß unter mehrmaligem Umschütteln bei Zimmertemperatur 6 Tage stehengelassen. Dann wurde die Lösung in überschüssige Na_2CO_3-Lösung gegeben, die organische Phase abgetrennt und mit Wasser neutral gewaschen. Nach Einengen im Vakuum wurde der Rückstand in Äther aufgenommen, die Lösung mit $KHCO_3$-Lösung und Wasser sorgfältig gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Dann wurde das Lösungsmittel abgezogen. Das entstandene Öl konnte nicht kristallisiert werden und wurde deshalb so weiterverarbeitet.

Ausbeute 19,5 g Öl (68 %)

f) Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-β-t.-butylester-DCHA-Salz (Z-L-Asp(OtBu)-OH·DCHA)

19,5 g (0,055 Mol) Z-L-Asparaginsäurediester wurden in 160 ml Dioxan und 30 ml Wasser gelöst und mit 55 ml 1 N NaOH am Autotitrator bei pH 12 verseift. Anschließend wurde auf 0° C gekühlt und mit 1 N HCl auf pH 7 eingestellt. Das Dioxan wurde am Rotationsverdampfer abgezogen, dann wurde auf pH 9 gestellt und mit Essigester der nicht umgesetzte Diester extrahiert. Anschließend wurde mit Äther überschichtet und mit 1 N HCl auf pH 1,5 gestellt. Dadurch wurde der Ester gefällt und im Äther gelöst. Die Ätherphase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert, dann der Äther abgezogen. Der Rückstand wurde mit 10,8 g (0,063 Mol) Dicyclohexylamin in etwas Äther versetzt. Die Reaktionsmischung wurde zwei Tage im Kühlschrank stehengelassen, abfiltriert und mit kaltem Äther gewaschen

Ausbeute 23 g (83 %)

Smp.: 122-123° C Lit.: 125,5-126,5° C (103)

R_f-Werte: 0,55 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,93 ($CHCl_3$/MeOH/HAc/H_2O 60:45:6:14)
0,73 (Methyläthylketon/HAc/H_2O/Pyridin 7:1:2:3)

Elementaranalyse ber.: 66,64 % C, 8,79 % H, 5,55 % N
gef.: 66,49 % C, 8,67 % H, 5,47 % N

g) L-Asparaginsäure-β-t.-butylester (H-L-Asp(OtBu)-OH)

23 g (0,046 Mol) Z-L-Asp(OtBu)-OH·DCHA wurden mit 55 ml 1 N H_2SO_4 bei 0° C zerlegt und der freie Ester sofort in 150 ml überschichtetem Äther aufgenommen. Die Ätherphase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und anschließend das Lösungsmittel abgezogen.

Das angefallene Z-L-Asp(OtBu)-OH wurde in 200 ml Metha-

nol gelöst und mit 800 mg Pd-Kohle (10 % Pd) unter kräftigem Rühren 4 Stunden lang hydriert. Das entstandene Gel wurde mit soviel Methanol versetzt, daß vom Katalysator abfiltriert werden konnte, dann wurde das Lösungsmittel teilweise abgezogen und das Produkt mit Äther ausgefällt. Es fiel ein gallertiger Niederschlag sofort aus, der aus Methanol/Äther umkristallisiert werden konnte.

Ausbeute 7 g (80 %)

Smp.: 194-195° C (Zers.) Lit.: 188,5°(Zers.)(106)
195° C (Zers.) (103)

$[\alpha]_D^{20}$ = +8,3° (c=1,H_2O) Lit.: $[\alpha]_D^{20}$ = +8,4° (c=1,H_2O)

R_f-Werte: 0,30 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,49 (n-Butanol/Pyridin/HAc/H_2O 30:20:6:24)
0,36 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)
0,57 (Methyläthylketon/HAc/H_2O/Pyridin 7:1:2:3)

Elementaranalyse ber.: 50,78 % C, 7,99 % H, 7,40 % N
gef.: 50,59 % C, 8,17 % H, 7,42 % N

h) t.-Butyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-β-t.-butylester (Boc-L-Asp(OtBu)-OH

7 g (0,037 Mol) H-L-Asp(OtBu)-OH wurden in 18,5 ml 2 N NaOH gelöst und eine Lösung von 6,3 g (0,044 Mol) Boc-N_3 in 16 ml Methanol zugegeben. Unter Rühren wurde dazu während einer Stunde bei 40° C 5,6 ml Triäthylamin in 20 ml Methanol zugetropft. Dann wurde noch 12 Stunden weitergerührt, dann der pH-Wert mit 2 N HCl auf 7 gestellt. Anschließend wurde im Vakuum das Methanol entfernt, die verbleibende Lösung mit Äther überschichtet, bei 0° C mit 140 ml 1 N HCl angesäuert, dann die Ätherphase abgetrennt und die wässrige Phase mehrmals mit Äther extrahiert. Die Ätherextrakte wurden öfters mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und dann das Lösungsmittel abgezogen. Das verbleibende Öl konnte aus Petroläther 30-50 und sehr wenig Äther zur Kristallisation gebracht werden. Umkristalli-

siert wurde aus Petroläther.
Ausbeute 6,5 g (61 %)
Smp.: 63-64° C Lit.: 63-66° C (107)
$[\alpha]_D^{20}$ = -21,3°(c=1, DMF) Lit.: $[\alpha]_D^{29}$ = -21,7 (c=1,DMF)
R_f-Werte: 0,65 (n-Butanol/Eisessig/Wasser 3:1:1)
0,90 (Methyläthylketon/HAc/H_2O/Pyridin 7:1:2:3)
0,75 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)
Elementaranalyse ber.: 53,96 % C, 8,01 % H, 4,84 % N
gef.: 53,81 % C, 8,04 % H, 4,85 % N

Darstellung von t.-Butyloxycarbonyl-L-Glutaminsäure-

γ -t.-butylester (Boc-L-Glu(OtBu)-OH)

a) Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure (Z-L-Glu(OH)-OH)

221 g (1,5 Mol) L-Glutaminsäure wurden in 400 ml Wasser suspendiert und vorsichtig mit 253,5 g (3 Mol) $NaHCO_3$ versetzt. Zu dieser Suspension wurde gleichzeitig 255 g (1,5 Mol) Z-Cl und 2 N NaOH zugetropft. Nach beendeter Z-Cl-Zugabe wurde auf pH 9 eingestellt und die restliche 2 N NaOH am pH-Stat zugetropft. Die Reaktion war nach ca. 5 Stunden beendet, der Gesamtverbrauch an NaOH betrug 2,1 l. Dann wurde mit 2 N H_2SO_4 auf pH 2 gestellt, dreimal mit je 300 ml Essigester extrahiert und über Na_2SO_4 getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel abgezogen und das Produkt aus dem Öl in der Kälte auskristallisiert. Umkristallisiert wurde aus Essigester/Petroläther.
Ausbeute 344 g (81,5 %).
Smp.: 110-112° C Lit.: 120-122° C (108)
$[\alpha]_D^{20}$ = -7,7° (c=3,HAc) Lit.: $[\alpha]_D^{20}$ = -7,9 (c=10,HAc)
R_f-Werte: 0,53 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)
0,89 ($CHCl_3$/MeOH/HAc/H_2O 60:45:6:14)
0,57 (n-Butanol/Pyridin/HAc/H_2O 30:20:6:24)
Elementaranalyse ber.: 55,51 % C, 5,38 % H, 4,98 % N
gef.: 55,54 % C, 5,42 % H, 4,88 % N

b) Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäureanhydrid

340 g (1,2 Mol) Z-L-Glutaminsäure wurden in 800 ml Acetanhydrid suspendiert und bei Zimmertemperatur so lange gerührt, bis sich alles gelöst hatte (1-2 Tage). Dann wurde das Lösungsmittel bei 40° C abdestilliert, der Rückstand in 320 ml $CHCl_3$ gelöst und mit 1,3 l absolutem Äther versetzt. Im Kühlschrank kristallisierte das Anhydrid in schönen Kristallen aus.

Ausbeute 246 g (78 %)

Smp.: 89-91° C Lit.: 90-92° C (109)

$[\alpha]_D^{20}$ = -44,2° (c=5, HAc) Lit.: $[\alpha]_D^{20}$ = -45,1° (c=9,98, HAc)

R_f-Werte: 0,65 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,79 ($CHCl_3$/MeOH/HAc/H_2O 60:45:6:14)
0,56 (n-Butanol/Pyridin/HAc/H_2O 30:20:6:24)
0,85 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)

Elementaranalyse ber.: 59,31 % C, 4,98 % H, 5,32 % N
gef.: 59,12 % C, 5,18 % H, 5,39 % N

c)Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-α-methylester-γ-DCHA-Salz (Z-L-Glu(OH)-OMe· DCHA)

Zu einer Lösung von 240 g (0,91 Mol) Z-L-Glutaminsäureanhydrid in 3 l absolutem Äther und 1,34 l absolutem Methanol wurden unter Rühren 215 ml Dicyclohexylamin in 340 ml absolutem Äther zugetropft. Nach mehrstündigem Rühren und anschließendem Stehenlassen über Nacht wurde das ausgefallene DCHA-Salz abgesaugt, sorgfältig mit Äther gewaschen und getrocknet.

Ausbeute 202 g (47 %)

Smp.: 171-172° C Lit.: 171-173° C (110)

$[\alpha]_D^{20}$ = -10,5° (c=1, MeOH) Lit.: $[\alpha]_D^{20}$ = -10,6 (c=1, MeOH)

R_f-Werte: 0,75 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,67 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)
0,62 (n-Butanol/Pyridin/HAc/H_2O 30:20:6:24)

0,88 ($CHCl_3$/MeOH/HAc/H_2O 60:45:6:24)
Elementaranalyse ber.: 65,52 % C, 8,46 % H, 5,88 % N
gef.: 65,25 % C 8,46 % H, 5,90 % N

d) Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-α-methylester (Z-L-Glu(OH)-OMe)

200 g (0,42 Mol) Z-L-Glu-α-OMe-γ-DCHA-Salz wurden in 500 ml Essigester suspendiert und mit 130 ml 2,5 N HCl in Essigester fünf Stunden lang gerührt. Dann wurde der Niederschlag abgesaugt, gut mit Essigester ausgewaschen und die vereinigten Filtrate dreimal mit Wasser extrahiert. Darauf wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Das erhaltene Öl kristallisierte nach Animpfen im Kühlschrank.
Ausbeute 113,4 g (91 %)
Smp.: 64°-66° C
R_f-Werte: 0,80 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)
0,77 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,96 ($CHCl_3$/MeOH/HAc/H_2O 60:45:6:24)
Elementaranalyse ber.: 56,94 % C, 5,80 % H, 4,74 % N
gef.: 56,79 % C, 5,76 % H, 4,64 % N

e) Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-α-methyl-γ-t.-butylester (Z-L-Glu(OtBu)-OMe)

110 g (0,37 Mol) Z-L-Glu(OH)-OMe wurden in 500 ml absolutem Methylenchlorid gelöst und in einen druckfesten Kolben überführt. Danach wurde die Lösung auf -15° C abgekühlt und 5 ml konzentrierte HCl und ca. 400 ml Isobutylen zugegeben. Dann wurde der Kolben 4 Tage verschlossen bei Zimmertemperatur aufbewahrt, wobei gelegentlich umgeschüttelt wurde. Anschließend wurde das Isobutylen und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen, der Rückstand in Essigester aufgenommen, mit 5 %iger $NaHCO_3$-Lösung und mit Wasser mehrmals gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Dann wurde das Lösungsmittel

abgezogen. Es blieb ein farbloses Öl, das nicht kristallisierte.

Ausbeute 118,5 g (91 %)

Elementaranalyse ber.: 61,52 % C, 7,17 % H, 3,99 % N
gef.: 61,41 % C, 7,30 % H, 4,04 % N

f) Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-t.-butylester-DCHA-Salz (Z-L-Glu(OtBu)-OH·DCHA)

115 g (0,33 Mol) Z-L-Glu(OtBu)-OMe wurden in 400 ml Dioxan gelöst und mit 330 ml 1 N NaOH am Autotitrator bei pH 9 verseift. Anschließend wurde auf 0° C gekühlt, mit 1 N HCl auf pH 7 gestellt und das Dioxan am Rotationsverdampfer abgezogen. Dann wurde auf pH 9 gestellt und der nicht umgesetzte Diester mit Essigester extrahiert. Anschließend wurde mit Äther überschichtet und mit 1 N HCl auf pH 1,5 gebracht. Der ausgefallene Monoester wurde im Äther aufgenommen, die Ätherphase abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit Wasser extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet, dann abfiltriert, der Äther abgezogen und der Rückstand mit 69 g (0,38 Mol) Dicyclohexylamin in etwas Äther versetzt. Das Produkt fiel sofort aus. Es wurde noch zwei Tage im Kühlschrank stehengelassen, dann abfiltriert und mit kaltem Äther gewaschen.

Ausbeute 146 g (85 %)

Smp.: 138-139° C Lit.: 139° C (111)

$[\alpha]_D^{20}$ = +9,8° (c=1,EtOH) Lit.: $[\alpha]_D^{20}$ = +9,72 (c=2,EtOH)

R_f-Werte: 0,64 (n-Butanol/HAc/Pyridin/H_2O 30:6:20:24)
0,69 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)
0,76 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,89 ($CHCl_3$/MeOH/HAc/H_2O 60:45:6:24)

Elementaranalyse ber.: 67,15 % C, 8,94 % H, 5,40 % N
gef.: 67,17 % C, 8,98 % H, 5,54 % N

g) Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-t.-butylester (Z-L-Glu(OtBu)-OH)

140 g (0,27 Mol) Z-L-Glu(OtBu)-OH·DCHA wurden in 1 l Äther aufgeschlämmt und tropfenweise unter Rühren mit 340 ml 1 N H_2SO_4 versetzt. Dann wurde die Ätherphase abgetrennt, mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und abfiltriert. Dann wurde das Lösungsmittel abgezogen. Es blieb ein Öl, das nicht kristallisierte.

Ausbeute 70 g Öl (77 %)
Elementaranalyse ber.: 60,52 % C, 6,87 % H, 4,15 % N
gef.: 60,41 % C, 6,98 % H, 4,23 % N

h) L-Glutaminsäure-γ-t.-butylester (H-L-Glu(OtBu)-OH)

70 g (0,2 Mol) Z-L-Glu(OtBu)-OH wurden in 300 ml absolutem Methanol gelöst und mit 0,3 ml Eisessig versetzt. Dann wurde mit 2 g Pd-Aktivkohle (10 % Pd) versetzt und 20 Stunden lang bei Normaldruck und Zimmertemperatur hydriert. Anschließend wurde vom Katalysator abfiltriert, das Lösungsmittel teilweise abgezogen und das Produkt mit Äther ausgefällt.

Ausbeute 13,5 g (33 %)
Smp.: 168-169° C Lit.: 168-169° C (111)
$[\alpha]_D^{20}$ = -8,2° (c=1, H_2O) Lit.: $[\alpha]_D^{20}$ = -8,15° (c=2,H_2O)
R_f-Werte: 0,53 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)
0,24 ($CHCl_3$/MeOH 1:1)
0,20 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)
Elementaranalyse ber.: 53,20 % C, 8,43 % H, 6,89 % N
gef.: 53,12 % C, 8,52 % H, 6,79 % N

i) t.-Butyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-t.-butylester (Boc-L-Glu(OtBu)-OH)

12,2 g (0,06 Mol) H-L-Glu(OtBu)-OH wurden nach der pH-

Stat-Methode von Schnabel (92) in 150 ml Dioxan/Wasser 1:1 aufgeschlämmt, mit 9,4 g (0,066 Mol) Boc-N_3 versetzt und am Autotitrator bei pH 9,5 mit 4 N NaOH titriert. Verbrauch an NaOH: 30 ml. Die Reaktionszeit betrug 20 Stunden. Dann wurde das überschüssige Boc-N_3 ausgeäthert, die wässrige Phase auf pH 2 gestellt und mit Essigester das Produkt extrahiert. Es wurde über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und mit Petroläther 30-50 ausgefällt.

Ausbeute 9,2 g (51 %)

Smp.: 99-101° C Lit.: 101-102° C (112)

$[\alpha]_{578}^{20}$ = -10,9° (c=1, MeOH) Lit.: $[\alpha]_{578}^{20}$ = -11,1° (c=1, MeOH) (92)

R_f-Werte: 0,80 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,87 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc/40:20:10:5)
0,81 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)

Elementaranalyse ber.: 55,43 % C, 8,31 % H, 4,62 % N
gef.: 55,32 % C, 8,42 % H, 4,55 % N

N^{α},N^{im}-Bisadamantyloxycarbonyl-L-histidin

Adoc-L-His(Adoc)-OH

10 g (47,8 mMol) L-Histidinhydrochloridmonohydrat wurden in 48 ml 1 N NaOH-Lösung gelöst und 10,6 g (100 mMol) Na_2CO_3 zugegeben. Aus einer Lösung von 21,4 g (100 mMol) Adoc-Cl in Benzol wurde das Lösungsmittel bei 30° C im Vakuum abdestilliert und noch zweimal Cyclohexan zugegeben und jeweils wieder vollständig abgezogen. Der Rückstand wurde in 30 ml Dioxan gelöst und in 5 Portionen innerhalb 45 Minuten zu der Histidin-Lösung, die auf einem Eisbad gerührt wurde, zugegeben. Dann wurde weitere 75 Minuten gerührt und anschließend dreimal mit Äther extrahiert. Der entstandene Niederschlag wurde durch Zugabe von etwas Wasser wieder in Lösung gebracht. Dann wurde auf 0° C gekühlt, mit Äther überschichtet und mit 20 ml 85 %iger H_3PO_4 angesäuert. Die Ätherphase wurde

abgetrennt und die wässrige Phase noch dreimal mit Äther extrahiert. Dann wurden die vereinigten Ätherphasen über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen. Es blieb ein öliger Rückstand, der in Äther aufgenommen wurde. Nach Zugabe von Cyclohexan und etwas Petroläther fiel das Produkt im Kühlschrank aus. Umkristallisiert wurde aus einer Mischung von Äther und Cyclohexan mit Petroläther.

Ausbeute 15 g (61 %)

Smp.: 143-148° C Lit.: 140-145° C (53)

$[\alpha]_D^{20}$ = +12,6° (c=1, MeOH) Lit.: $[\alpha]_D^{20}$ = +12,5 (c=2, MeOH)

R_f-Werte: 0,61 (n-Butanol/Pyridin/HAc/H_2O 30:20:6:24)
0,70 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,66 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)

Elementaranalyse ber.: 65,73 % C, 7,29 % H, 8,21 % N
gef.: 65,56 % C, 7,37 % H, 8,04 % N

Darstellung der Aminosäureester

1) L-Leucinmethylesterhydrochlorid (H-L-Leu-OMe·HCl)

Ein Strom trockenes HCl-Gas wurde schnell durch eine Suspension von 95 g (0,72 Mol) L-Leucin in 1500 ml absolutem Methanol ohne äußere Kühlung geleitet. Nachdem alle Aminosäure in Lösung gegangen war, wurde die heiße Reaktionsmischung in einem Eisbad gekühlt und weiterhin bis zur Sättigung bei 0-5° C HCl eingeleitet. Dann wurde die Reaktionsmischung 3-4 Stunden bei Zimmertemperatur unter Feuchtigkeitsausschluß stehengelassen. Anschließend wurde ein Teil des Methanols abgezogen, mit etwas Äther versetzt und in der Kälte auskristallisiert. Dann wurde abfiltriert, mit kaltem Methanol gewaschen und über KOH im Vakuum getrocknet. Umkristallisiert wurde mehrmals aus Methanol/Äther.

Ausbeute 55 g (42 %)

Smp.: 148-149° C Lit.: 150-151° C (113)

$[\alpha]_{578}^{20}$ = -28° (c=1, HAc) Lit.: $[\alpha]_{578}^{20}$ = -30° (c=1, HAc)

R_f-Werte: 0,49 ($CHCl_3$/MeOH 1:1)
0,71 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)
0,43 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,60 (n-Butanol/Pyridin/HAc/H_2O 30:20:6:24)

Elementaranalyse ber.: 46,28 % C, 8,88 % H, 7,71 % N
gef.: 46,03 % C, 8,92 % H, 7,81 % N

2) O-Benzyl-L-serinäthylesterhydrochlorid

(H-L-Ser(Bzl)-OEt·HCl)

5 g (25,6 mMol) O-Benzyl-L-serin wurden in 50 ml absolutem Äthanol suspendiert. Dann wurde bis zur Sättigung bei 5-10° C trockene HCl eingeleitet, anschließend wurde 10 Minuten im Wasserbad erhitzt, dann rasch abgekühlt und im Vakuum zur Trockene eingedampft. Danach wurde in Äthanol aufgenommen, wieder eingedampft und noch einmal in Äthanol gelöst, dann das Produkt mit Äther ausgefällt. Um ein reines Produkt zu erhalten, war es erforderlich mehrmals aus Äthanol/Äther umzukristallisieren.

Ausbeute 6 g (90 %)
Smp.: 147-149° C
$[\alpha]_{578}^{20}$ = -7,8° (c=0,6, H_2O)
R_f-Werte: 0,54 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)
0,74 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)

Elementaranalyse ber.: 55,49 % C, 6,98 % H, 5,39 % N
gef.: 55,51 % C, 6,88 % H, 5,41 % N

3) O-Benzyl-L-serinmethylesterhydrochlorid

(H-L-Ser(Bzl)-OMe·HCl)

Zu 125 ml absolutem Methanol wurden unter guter Kühlung langsam 7,5 ml (0,1 Mol) $SOCl_2$ zugetropft. Dann wurden zu der Lösung 19,52 g (0,1 Mol) O-Benzyl-L-serin gege-

ben und langsam auf Zimmertemperatur erwärmt. Anschließend wurde über Nacht am Rückfluß gekocht. Dann wurde das Methanol teilweise abgezogen und der Ester mit Äther in der Kälte ausgefällt. Es wurde mit Äther, dann mit Essigester und schließlich wieder mit Äther gut gewaschen und über KOH im Vakuum getrocknet. Umkristallisiert wurde aus Methanol durch Zugabe von Äther.

Ausbeute 22,6 g (92 %)

Smp.: 167-169° C Lit.: 169° C (114)

$[\alpha]_{578}^{20}$ = -2,9 (c = 3, H_2O) Lit.: $[\alpha]_D^{13}$ = -2,7 (c = 3, H_2O)

R_f-Werte: 0,52 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)
0,86 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)
0,73 (Methyläthylketon/HAc/H_2O/Pyridin 7:1:2:3)

Elementaranalyse ber.: 53,77 % C, 6,56 % H, 5,70 % N
gef.: 53,81 % C, 6,71 % H, 5,70 % N

Darstellung der Ornithin-Tripeptide

1) N^{α}-t.-Butyloxycarbonyl-N^{δ}-benzyloxycarbonyl-L-ornithyl-L-leucinmethylester (Boc-L-Orn(Z)-Leu-OMe)

31 g (0,17 Mol) L-Leucinmethylesterhydrochlorid wurden in 200 ml Essigester aufgeschlämmt und mit 17,4 g (0,17 Mol) Triäthylamin neutralisiert. Das ausgefallene Triäthylammoniumhydrochlorid wurde abgesaugt, aus dem Filtrat das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand in 250 ml Methylenchlorid aufgenommen. Zu dieser Lösung wurden 62 g (0,17 Mol) Boc-L-Orn(Z)-OH gegeben, anschließend auf 0° C gekühlt und 35 g (0,17 Mol) DCCI, gelöst in etwas Essigester, zugegeben. Dann wurde 4 Stunden bei 0° C gerührt, anschließend auf Zimmertemperatur gebracht. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abgesaugt, das Filtrat bei ca. 30° C am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft, mit Essigester

aufgenommen und je dreimal mit 5 %iger $NaHCO_3$ - Lösung, Wasser, 3 %iger HCl und wieder Wasser gewaschen. Es wurde über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert, das Lösungsmittel teilweise abgezogen und mit Hilfe von Petroläther 30-50 das Produkt auskristallisiert. Umkristallisiert wurde aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute 38 g (46 %)

Smp.: 87-88° C

R_f-Werte: 0,73 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)
0,85 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,86 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)
0,94 (Methyläthylketon/HAc/H_2O/Pyridin 7:1:2:3)

Elementaranalyse ber.: 60,83 % C, 7,96 % H, 8,51 % N
gef.: 60,99 % C, 7,91 % H, 8,56 % N

Aminosäureanalyse:

	gef.:	ber.:
Leu	0,99	1,00
Orn	1,00	1,00

2) N^{α}-t.-Butyloxycarbonyl-N^{δ}-benzyloxycarbonyl-L-ornithyl-L-leucinamid (Boc-L-Orn(Z)-Leu-NH_2)

5 g (10,1 mMol) Boc-L-Orn(Z)-Leu-OMe wurden in 80 ml absolutem Methanol gelöst und bei -15° C in diese Lösung trockenes NH_3 bis zur Sättigung eingeleitet. Die Lösung wurde dann 2 Tage unter Feuchtigkeitsausschluß bei Zimmertemperatur stehengelassen, dann wurde das Lösungsmittel weitgehend abgezogen und die verbleibende Lösung mit etwas Äther versetzt. Dabei fiel das Amid kristallin an.

Ausbeute 4,7 g (97 %)

Smp.: 150-151° C

R_f-Werte: 0,72 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)
0,83 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,86 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)

Elementaranalyse ber.: 60,23 % C, 8,00 % H, 11,71 % N
gef.: 60,40 % C, 8,04 % H, 11,65 % N

Aminosäureanalyse:	gef.:	ber.:
Leu	1,00	1,00
Orn	1,00	1,00

3) t.-Butyloxycarbonyl-L-ornithyl-L-leucinamid

Boc-L-Orn-Leu-NH_2

1,8 g (3,88 mMol) Boc-L-Orn(Z)-Leu-NH_2 wurden in 80 ml Methanol gelöst, mit 100 mg Pd-Aktivkohle (10 % Pd) versetzt und 18 Stunden bei Zimmertemperatur und Normaldruck hydriert. Dann wurde vom Katalysator abfiltriert, das Lösungsmittel abgezogen, in Äther aufgenommen und mit Petroläther 30-50 auskristallisiert.
Ausbeute 1,2 g (90 %)
Smp.: 150-152° C
R_f-Werte: 0,42 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)
0,73 ($CHCl_3$/MeOH/HAc/H_2O 60:45:6:14)
0,64 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)
Elementaranalyse ber.: 55,78 % C, 9,36 % H, 16,26 % N
gef.: 55,59 % C, 9,28 % H, 16,15 % N

Aminosäureanalyse:	gef.:	ber.:
Leu	1,04	1,00
Orn	1,00	1,00

4) t.-Butyloxycarbonyl-L-glutaminyl-N^{δ}-benzyloxycarbonyl-L-ornithyl-L-leucinmethylester (Boc-L-Gln-Orn(Z)-Leu-OMe)

9 g (18,2 mMol) Boc-L-Orn(Z)-Leu-OMe wurden 30 Minuten lang in einer Mischung von 50 ml Trifluoressigsäure und 50 ml Methylenchlorid bei Zimmertemperatur zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe gerührt. Dann wurde die Reaktionsmischung am Rotationsverdampfer bei 30-40° C zur Trockne eingedampft. Zur Entfernung der restlichen Trifluoressigsäure wurde in CCl_4 aufgenommen und wieder

eingedampft. Der Rückstand wurde in 25 ml absolutem Dimethylformamid aufgenommen. Die Lösung wurde mit Triäthylamin auf pH 8 gebracht und mit 6,7 g (18,2 mMol) Boc-L-Gln-ONp, gelöst in etwas DMF, versetzt und 22 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Anschließend wurde das Peptid durch Zugabe von ca. 200 ml Wasser ausgefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, in 100 ml Essigester gelöst und je dreimal mit 5 %iger $NaHCO_3$-Lösung, mit Wasser und mit 3%-iger HCl und anschließend mit Wasser wieder neutral gewaschen. Es wurde über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert, der Essigester teilweise abgezogen und mit Petroläther 30-50 auskristallisiert. Umkristallisiert wurde aus Essigester und etwas Äthanol durch Zugabe von Petroläther.

Ausbeute 6 g (53 %)

Smp.: 148-151° C (Zersetzung)

R_f-Werte: 0,95 ($CHCl_3$/MeOH/HAc/H_2O 60:45:6:14)
0,73 ($CHCl_3$/MeOH 1:1)
0,75 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,74 (n-Butanol/Pyridin/HAc/H_2O 30:20:6:24)
0,84 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)

Elementaranalyse ber.: 57,96 % C, 7,62 % H, 11,27 % N
gef.: 57,88 % C, 7,55 % H, 11,19 % N

Aminosäureanalyse

	gef.:	ber.:
Glu	1,01	1,00
Leu	1,00	1,00
Orn	1,00	1,00

5) t.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-N^{δ}-benzyloxycarbonyl-L-ornithyl-L-leucinmethylester (Boc-L-Ala-Orn(Z)-Leu-OMe)

4,5 g (9,1 mMol) Boc-L-Orn(Z)-Leu-OMe wurden zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit 25 ml Trifluoressigsäure und 25 ml Methylenchlorid 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur gerührt. Dann wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in 100 ml 5 %iger $NaHCO_3$-

Lösung aufgenommen und mit Essigester extrahiert. Dann wurde 2 Stunden über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und auf 50 ml eingeengt. Anschließend wurden 1,7 g (9,1 mMol) Boc-L-Alanin, gelöst in 5 ml Essigester, zugegeben und auf 0° C gekühlt. Nach Zugabe von 1,88 g (9,1 mMol) DCCI, gelöst in etwas Essigester, wurde 4 Stunden bei 0° C gerührt. Die Lösung wurde dann mehrmals mit 5%-iger $NaHCO_3$-Lösung, mit Wasser und mit 3%-iger HCl, dann wieder mit Wasser neutral gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Peptid wurde mit Petroläther 30-50 aus der Essigesterlösung ausgefällt und aus Essigester durch Zugabe von Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute 2,5 g (49 %)

Smp.: 127-129° C

R_f-Werte: 0,80 ($CHCl_3$/MeOH 1:1)
0,84 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,86 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)
0,96 ($CHCl_3$/MeOH/HAc/H_2O 60:45:6:14)
0,88 (n-Butanol/Pyridin/HAc/H_2O 30:20:6:24)

Elementaranalyse ber.: 59,56 % C, 7,85 % H, 9,92 % N
gef.: 59,55 % C, 7,94 % H, 9,83 % N

Aminosäureanalyse:

	gef.:	ber.:
Ala	0,99	1,00
Leu	1,00	1,00
Orn	1,03	1,00

6)t.-Butyloxycarbonyl-L-seryl-N^{δ}-benzyloxycarbonyl-L-ornithyl-L-leucinmethylester (Boc-L-Ser-Orn(Z)-Leu-OMe)

6 g (12,1 mMol) Boc-L-Orn(Z)-Leu-OMe wurden in einer Mischung von 25 ml Trifluoressigsäure und 25 ml Methylenchlorid 30 Minuten lang gerührt, um die Boc-Schutzgruppe abzuspalten. Dann wurde im Vakuum zur Trockene eingedampft und der Rückstand in 100 ml 5%-iger $NaHCO_3$-Lösung aufgenommen, mit Essigester dreimal extrahiert und die vereinigten Extrakte über Na_2SO_4 2 Stunden ge-

trocknet. Anschließend wurde abfiltriert und die Lösung auf 50 ml eingeengt. Zu dieser Lösung wurde 2,5 g (12,1 mMol) Boc-L-Serin gegeben. Die Lösung wurde auf 0° C gekühlt und mit 2,25 g (10,9 mMol) DCCI, gelöst in etwas Essigester versetzt. Es wurde hier ein Unterschuß an DCCI verwendet, da das Boc-L-Serin mit freier Hydroxylgruppe gekuppelt wurde. Die Reaktionsmischung wurde drei Stunden bei 0° C gerührt, dann wurde der gebildete Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Die Lösung wurde je dreimal mit 5%-iger $NaHCO_3$-Lösung, mit Wasser und mit 3%-iger HCl gewaschen. Anschließend wurde mit Wasser neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, dann abfiltriert, das Lösungsmittel teilweise abgezogen und durch Zugabe von Petroläther auskristallisiert. Es wurde aus Essigester/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute 2,2 g (31 %)

Smp.: 63-65° C

R_f-Werte: 0,79 ($CHCl_3$/MeOH 1:1)
0,79 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,86 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)
0,90 ($CHCl_3$/MeOH/HAc/H_2O 60:45:6:14)
0,78 (n-Butanol/Pyridin/HAc/H_2O 30:20:6:24)

Elementaranalyse ber.: 57,92 % C, 7,64 % H, 9,65 % N
gef.: 57,81 % C, 7,66 % H, 9,59 % N

Aminosäureanalyse:

	gef.:	ber.:
Ser	0,88	1,00
Orn	1,02	1,00
Leu	1,00	1,00

Liquid-Phase-Synthese der Sequenz 15 - 27 des Secretins

Boc-L-Asp(OtBu)-Ser(Bzl)-Ala-Orn(Z)-Leu-Gln-Orn(Z)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH_2

1) Versterung des Boc-L-Valin mit dem Polyäthylenglykol

25 g Polyäthylenglykol,(Molekulargewicht 10 000), das

anschließend noch eine Stunde am Rückfluß gekocht. Die anschließende Aminosäureanalyse ergab eine Abnahme der Veresterungsrate mit Boc-L-Valin auf 81 %. Deshalb ist eine Blockierung nicht umgesetzter OH-Funktionen am PEG nicht unbedingt empfehlenswert, da unter Kupplungsbedingungen freie OH-Gruppen am Polymer kaum angegriffen werden und bei der Blockierung fast immer ein Beladungsverlust durch Umesterung auftritt.

2) Abspaltung der Boc-Schutzgruppe

Zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurden 23 g Boc-L-Val-PEG (Veresterungsgrad 81 %, restliche, freie OH-Gruppen durch Acylierung blockiert) in 230 ml 1,2 N HCl in Eisessig gelöst und 20 Minuten bei Zimmertemperatur gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel weitgehend abgezogen und das Produkt mit Äther ausgefällt und sehr gut mit absolutem Äther gewaschen. Es wurde noch einmal in warmem Äthanol aufgenommen und wieder mit Äther bei -20° C ausgefällt. Das Verschwinden der Urethan-Bande im IR-Spektrum zeigte die völlige Abspaltung der Boc-Schutzgruppe.

3) Kupplung der Boc-Aminosäuren

a) Kupplung von Boc-L-Leu-OH

5,13 g (22,2 mMol) wasserfreies Boc-L-Leu-OH und 2,29 g (11,1 mMol) DCCI wurden jeweils in einigen Millilitern Methylenchlorid gelöst, auf 0° C abgekühlt, dann wurden die Lösungen zusammengegeben und 30 Minuten bei 0° C voraktiviert. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und das Filtrat zu der Lösung von 23 g HCl·H-L-Val-PEG in 200 ml absolutem CH_2Cl_2 gegeben. Anschließend wurde der pH mit N-Methylmorpholin auf 7 - 8 gebracht und die Lösung 2 Stunden bei Zimmertemperatur

gerührt. Dann wurde im Vakuum eingeengt und mit Äther das Boc-L-Leu-Val-PEG ausgefällt. Das ausgefallene Produkt wurde getrocknet und aus Äthanol/Äther umgefällt, um die restlichen Spuren von Boc-Aminosäure zu entfernen. Dann wurde im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknet.

Zur Umsatzkontrolle wurden 50 mg PEG-Peptid in 1 ml Wasser gelöst und mit 1 ml Stein-Moore-Lösung (74) versetzt. Diese Mischung wurde 20 Minuten in einem Wasserbad auf 85 bis 90° C erhitzt. Da keine Blaufärbung auftrat, konnte angenommen werden, daß ein vollständiger Umsatz erreicht worden war.

Zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde eine 10%-ige Lösung des PEG-Peptids in 1,2 N HCl in Eisessig 20 Minuten bei Zimmertemperatur gerührt, dann teilweise eingeengt und mit absolutem Äther ausgefällt, sehr sorgfältig mit absolutem Äther gewaschen und aus Athanol/Äther umgefällt. Die vollständige Abspaltung der Schutzgruppe wurde wieder durch das völlige Fehlen der Urethanbande im IR-Spektrum gezeigt.

b) H-Gly-Leu-Val-PEG

5,05 g (28,8 mMol) Boc-Glycin wurden mit 2,97 g (14,4 mMol) DCCI eine Stunde voraktiviert, der entstandene Harnstoff abfiltriert und das Filtrat zu der 10%-igen Lösung von 3,6 mMol PEG-Peptid in CH_2Cl_2 gegeben, mit N-Methylmorpholin neutralisiert und zwei Stunden gekuppelt. Dann wurde das Lösungsmittel wieder teilweise abgezogen, mit Äther auskristallisiert und aus Äthanol/Äther umgefällt. Der Ninhydrintest zeigte einen vollständigen Umsatz.

Die Boc-Schutzgruppe wurde wieder wie bei der vorigen Aminosäure abgespalten. Dann wurde eine Probe von ca.

20 mg entnommen und in 6 N HCl bei 110° C 24 Stunden lang hydrolysiert. Die Aminosäureanalyse ergab folgende Werte:

Aminosäure	gefunden	berechnet
Gly	0,97	1,00
Val	1,03	1,00
Leu	1,00	1,00

c) H-L-Gln-Gly-Leu-Val-PEG

6,76 g (18,4 mMol, 5-facher Überschuß) Boc-L-Gln-ONp wurden zu einer Lösung von 23 g (3,6 mMol) PEG-Peptid in 100 ml absolutem CH_2Cl_2 und 80 ml absolutem DMF gegeben und der pH-Wert mit N-Methylmorpholin auf 7 gestellt. Dann wurde eine Stunde bei Zimmertemperatur gerührt und anschließend die Lösung im Vakuum auf ca. 100 ml eingeengt. Dann wurde 20 Stunden bei Zimmertemperatur weitergerührt, wobei durch gelegentliche Zugabe von N-Methylmorpholin der pH-Wert bei 7 gehalten wurde. Dann wurde mit Äther ausgefällt und der Umsatz mit Ninhydrin getestet. Es zeigte sich, daß der Umsatz nicht vollständig war, deshalb mußte nachgekuppelt werden. Dazu wurden 3,55 g (14,4 mMol) Boc-L-Gln-OH mit 1,3 g (6,3 mMol) DCCI bei -5° C zehn Minuten lang voraktiviert, der Harnstoff abfiltriert und das Filtrat zu der Lösung des Polymers in 200 ml absolutem Methylenchlorid gegeben. Es wurde 70 Minuten nachgekuppelt, dann wurde mit Äther ausgefällt und einmal aus Äthanol/Äther, dann aus DMF/CH_2Cl_2/Äther umkristallisiert. Dadurch ließen sich die Überschüsse beseitigen, was dünnschichtchromatographisch kontrolliert wurde. Eine anschließende Umsatzkontrolle mit Ninhydrin zeigte einen quantitativen Umsatz. Dann wurde die Boc-Schutzgruppe abgespalten, wobei die Abspaltung durch ein IR-Spektrum kontrolliert wurde. Anschließend wurde wieder eine Probe hydrolysiert und eine Aminosäureanalyse gemacht. Sie ergab folgende Werte:

Aminosäure	gefunden	berechnet
Glu	0,97	1,00
Gly	1,00	1,00
Val	1,13	1,00
Leu	1,05	1,00

d) H-L-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-PEG

5,11 g (22,08 mMol) Boc-L-Leu-OH wurden mit 2,27 g (11,04 mMol) DCCI 1 Stunde lang bei 0° C voraktiviert. Dann wurde der Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das Filtrat zu der Lösung von ca 22 g HCl·H-L-Gln-Gly-Leu-Val-PEG in 200 ml CH_2Cl_2 gegeben. Die Kupplungsdauer betrug 14 Stunden. Dann wurde mit Äther ausgefällt und aus Äthanol/Äther umgefällt bis das Produkt dünnschichtchromatographisch rein war. Eine anschließende Umsatzkontrolle mit Ninhydrin zeigte einen vollständigen Umsatz. Die Boc-Schutzgruppe wurde wieder in einer 10%-igen Lösung des Polymer-Peptids in 1,2 N HCl in Eisessig innerhalb 20 Minuten bei Zimmertemperatur abgespalten und die vollständige Abspaltung mit Hilfe des IR-Spektrums geprüft. Eine anschließend durchgeführte Aminosäureanalyse hatte folgendes Ergebnis:

Aminosäure	gefunden	berechnet
Glu	1,00	1,00
Gly	1,00	1,00
Val	1,01	1,00
Leu	1,92	2,00

e) H-L-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-PEG

Die Kupplung wurde unter den gleichen Bedingungen wie zuvor durchgeführt. Die Kupplungszeit wurde auf 2 Stunden reduziert. Ein anschließender Umsatztest mit Ninhydrin zeigte aber, daß die Kupplung nicht vollständig war. Deshalb wurde noch einmal mit voraktiviertem Boc-L-Leucin aus 5,11 g (22,08 mMol) Boc-L-Leu-OH und 2,27 g (11,04 mMol) DCCI in einer Lösung von 22 g PEG-Peptid

in 150 ml CH_2Cl_2 und 50 ml DMF zweieinhalb Stunden nachgekuppelt. Dann wurde wieder mit Äther ausgefällt und aus Äthanol/Äther umkristallisiert. Danach war der Umsatz vollständig. Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe wieder mit 1,2 N HCl/Eisessig abgespalten und die vollständige Abspaltung mit Hilfe des IR-Spektrums kontrolliert. Eine anschließende Aminosäureanalyse ergab folgende Werte:

Aminosäure	gefunden	berechnet
Glu	0,95	1,00
Gly	0,98	1,00
Val	1,01	1.00
Leu	3,00	3,00

f) H-L-Orn(Z)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-PEG

7,32 g (20 mMol) Boc-L-Orn(Z)-OH wurden mit 2,06 g (10 mMol) DCCI eine Stunde bei 0° C voraktiviert. Dann wurde der Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und die Lösung des Aminosäureanhydrids zu der Lösung von 15 g PEG-Peptid in 120 ml CH_2Cl_2 und 40 ml DMF gegeben. Es wurde mit N-Methylmorpholin neutralisiert und zwei Stunden gekuppelt. Dann wurde die Lösung eingeengt, mit Äther ausgefällt und aus Äthanol/Äther umgefällt bis das Produkt dünnschichtchromatographisch einheitlich war. Der anschließende Umsatztest mit Ninhydrin ergab vollständigen Umsatz. Die Boc-Schutzgruppe wurde mit 150 ml 1,2 N HCl in Eisessig innerhalb von 20 Minuten abgespalten. Eine Kontrolle durch IR-Spektrum auf Vollständigkeit der Abspaltung war nicht mehr möglich, da die Z-Schutzgruppe des Ornithins ebenfalls die C=O-Streckschwingung des Urethans zeigt.

g) H-L-Gln-Orn(Z)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-PEG

7,05 g (19,2 mMol) Boc-L-Gln-ONp wurden zu 15 g (2,4 mMol) PEG-Peptid, gelöst in 150 ml DMF, gegeben und die Lösung mit N-Methylmorpholin neutralisiert. Die Kupp-

lungsdauer bei Raumtemperatur betrug 35 Stunden. Dann wurde die Lösung eingeengt und mit Äther ausgefällt und aus DMF und etwas Methylenchlorid durch Zugabe von Äther umkristallisiert. Danach war das Produkt dünnschichtchromatographisch einheitlich. Eine anschließende Umsatzkontrolle mit Ninhydrin ergab einen vollständigen Umsatz. Zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde wieder in 150 ml 1,2 N HCl in Eisessig 20 Minuten gerührt, dann mit Äther ausgefällt, gut gewaschen und anschließend aus Äthanol/Äther umgefällt.

h) H-L-Leu-Gln-Orn(Z)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-PEG

5,11 g (22,08 mMol) Boc-L-Leu-OH, eine Stunde voraktiviert mit 2,28 g (11,04 mMol) DCCI, wurde in einer Lösung von 15 g PEG-Peptid in 150 ml CH_2Cl_2 und 20 ml DMF vier Stunden lang bei Zimmertemperatur gekuppelt. Nach Ausfällung mit Äther wurde aus einer Mischung von CH_2Cl_2 und DMF mit Äther umgefällt und anschließend noch aus Äthanol/Äther umkristallisiert.

Die Titration der nicht umgesetzten, noch protonierten Aminogruppen ergab einen Umsatz von 80 %. Zu dieser Umsatzkontrolle wurden ca. 50 mg PEG-Peptid mit $5 \cdot 10^{-3}$ N NaOH an einem Titrator mit Schreiber mit Hilfe einer Glaselektrode von ca. drei Millimetern Durchmesser in einem kleinen Reagenzglas titriert. Um auch noch kleine Mengen von nicht umgesetzten Aminofunktionen feststellen zu können, wurde zur Titration noch 1 µMol Glycinmethylesterhydrochlorid zugesetzt, da dann die beiden Wendepunkte der Titrationskurve von eventuell enthaltener Essigsäure oder Boc-Aminosäure und von Aminhydrochlorid besser getrennt werden und daher genauer bestimmt werden können.

Zur Nachkupplung wurde die gleiche Menge voraktivierter Aminosäure verwendet. Das PEG-Peptid war in einer Mi-

schung von 60 ml DMF und 70 ml CH_2Cl_2 gelöst. Die Reaktionsdauer betrug 2 Stunden. Die anschließende Titration ergab keine freien Aminofunktionen mehr, d.h. der Umsatz war vollständig. Nach der Umsatzkontrolle wurde die Boc-Schutzgruppe wie üblich abgespalten.

i) H-L-Orn(Z)-Leu-Gln-Orn(Z)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-PEG

10,83 g (29,6 mMol) Boc-L-Orn(Z)-OH wurden mit 3,05 g (14,8 mMol) DCCI eine halbe Stunde voraktiviert, zu 15 g PEG-Peptid (ca. 2,4 mMol) , gelöst in 70 ml DMF und 70 ml CH_2Cl_2, gegeben und mit N-Methylmorpholin neutralisiert. Die Reaktionszeit betrug 16 Stunden. Dann wurde die Lösung wieder eingeengt und das PEG-Peptid mit Äther ausgefällt und aus Äthanol/Äther umkristallisiert. Die Titration ergab einen vollständigen Umsatz, das PEG war frei von überschüssiger Boc-Aminosäure. Dann wurde die Boc-Schutzgruppe wieder abgespalten und anschließend ein kleiner Teil des PEG-Peptids zur Aminosäureanalyse hydrolysiert. Die Aminosäureanalyse hatte folgendes Ergebnis:

Aminosäure	gefunden	berechnet
Glu	1,94	2,00
Gly	1,00	1,00
Val	1,00	1,00
Leu	4,13	4,00
Orn	1,91	2,00

k) H-L-Ala-Orn(Z)-Leu-Gln-Orn(Z)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-PEG

5,6 g (29,6 mMol) Boc-L-Ala-OH wurden mit 3,05 g (14,8 mMol) DCCI bei 0° C 20 Minuten voraktiviert, der entstandene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das Filtrat zu der Lösung von 15 g (ca. 2,4 mMol) PEG-Peptid in 90 ml CH_2Cl_2 und 60 ml DMF gegeben und mit N-Methylmorpholin neutralisiert. Dann wurde drei Stun-

den bei Zimmertemperatur gerührt, anschließend mit Äther ausgefällt und aus Äthanol/Äther umkristallisiert.

Die Umsatzkontrolle durch Titration ergab kein freies Amin-hydrochlorid und keine freie Boc-Aminosäure mehr, d.h. der Umsatz war vollständig. Dann wurde die Boc-Schutzgruppe mit 180 ml 1,2 N HCl/Eisessig innerhalb von 20 Minuten bei Zimmertemperatur abgespalten. Anschließend wurde mit Äther ausgefällt und aus Äthanol/Äther und noch einmal aus einer Mischung von CH_2Cl_2 und DMF mit Äther umgefällt. Die Titration nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe ergab eine Beladung von 67 % bei der Annahme eines Molekulargewichts von 13 258. Eine anschließend durchgeführte Aminosäureanalyse hatte folgendes Ergebnis:

Aminosäure	gefunden	berechnet
Glu	1,81	2,00
Gly	1,00	1,00
Ala	0,94	1,00
Val	1,15	1,00
Leu	4,20	4,00
Orn	1,96	2,00

1) H-L-Ser(Bzl)-Ala-Orn(Z)-Leu-Gln-Orn(Z)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-PEG

7,08 g (24 mMol) Boc-L-Ser(Bzl)-OH, voraktiviert mit 2,48 g (12 mMol) DCCI, wurden zwei Stunden mit 13 g (ca. 1,34 mMol) PEG-Peptid, gelöst in 80 ml CH_2Cl_2 und 50 ml DMF, bei pH 7 gekuppelt. Dann wurde mit Äther ausgefällt und aus Äthanol/Äther umkristallisiert. Die anschließende Umsatzkontrolle durch Titration ergab über 99 % Umsatz. Dann wurde die Boc-Schutzgruppe auf die übliche Weise abgespalten und anschließend die Abspaltung durch Titration kontrolliert. Bei einem Molekulargewicht des PEG-Peptids von ca. 13 648 ergab die Titration wieder eine Beladung von 67 %, d.h. die Schutzgruppe war vollständig abgespalten.

m) Boc-L-Asp(OtBu)-Ser(Bzl)-Ala-Orn(Z)-Leu-Gln-Orn(Z)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-PEG

1,73 g (6 mMol) Boc-L-Asp(OtBu)-OH wurden zu 12,4 g (1,22 mMol bei 67 % Beladung) PEG-Peptid, gelöst in 100 ml CH_2Cl_2 und 20 ml DMF, gegeben, die Lösung mit 1,24 g (6 mMol) DCCI versetzt und mit N-Methylmorpholin neutralisiert. Dann wurde bei Zimmertemperatur 2 Stunden gekuppelt, der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, mit Äther ausgefällt und aus Äthanol/Äther umgefällt. Die anschließende Titration ergab nur die sehr niedrige Kupplungsausbeute von 43 %.

Zur Nachkupplung wurden die 12,4 g Träger mit 0,69 mMol nicht umgesetzten Aminofunktionen mit 2 g (6,9 mMol) Boc-L-Asp(OtBu)-OH und 1,42 g (6,9 mMol) DCCI 24 Stunden bei Zimmertemperatur und pH 7-8 gekuppelt. Dann wurde die Lösung eingeengt, der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, mit Äther ausgefällt und aus Äthanol/Äther umkristallisiert. Die anschließende Umsatzkontrolle durch Titration ergab dann einen Umsatz von 98 %. Da Asparaginsäure die letzte Aminosäure der darzustellenden Sequenz war, wurde auf eine nochmalige Nachkupplung verzichtet.

Der beladene Träger wurde im Hochvakuum über P_2O_5 gut getrocknet und anschließend ein kleiner Teil zur Aminosäureanalyse mit 6 N HCl bei 110° 24 Stunden hydrolysiert. Die Analyse hatte folgendes Ergebnis:

Aminosäure	gefunden	berechnet
Asp	1,22	1,00
Ser	0,98	1,00
Glu	1,87	2,00
Gly	1,00	1,00
Ala	0,89	1,00
Val	1,13	1,00
Leu	4,21	4,00
Orn	1,82	2,00

4) Abspaltung des Peptids vom Träger durch Ammonolyse

Boc-L-Asp(OtBu)-Ser(Bzl)-Ala-Orn(Z)-Leu-Gln-Orn(Z)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH_2

3,5 g beladener Träger wurden in einer möglichst dickwandigen Glasampulle in 20 ml absolutem DMF und 10 ml absolutem Methanol gelöst. Zu dieser Lösung wurde unter Feuchtigkeitsausschluß 40 ml trockenes NH_3 einkondensiert. Dann wurde die Ampulle verschlossen 8 Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen und öfters umgeschüttelt. Das NH_3 wurde ebenfalls unter Ausschluß von Feuchtigkeit abgedampft, das Lösungsmittel im Vakuum vollständig abgezogen und der trockene Rückstand mit 300 ml Wasser versetzt und die Suspension mehrere Stunden gerührt. Das in Wasser unlösliche Peptid wurde abzentrifugiert und über P_2O_5 getrocknet. Die Ausbeute betrug 230 mg Peptid. Die Gesamtausbeute von 12,4 g Träger betrug 643 mg Peptid, das bedeutet, daß ca. 28 % Peptid vom Polyäthylenglykol abgespalten worden waren. Das abgespaltene Peptid war dünnschichtchromatographisch einheitlich.

R_f-Werte: 0,87 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,61 (n-Butanol/Pyridin/Eisessig/H_2O 30:20:6:24)
0,93 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)
0,83 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)
0,83 ($CHCl_3$/MeOH 1:1)

Die Elektrophorese in 0,1%-iger Lösung von Eisessig/Ameisensäure 1:1 bei 1000 V und 6 mA ergab einen einheitlichen Fleck, der nicht gewandert war.

Elementaranalyse ber.: 58,84 % C, 7,65 % H, 13,28 % N
gef.: 58,48 % C, 8,23 % H, 12,90 % N

Aminosäureanalyse

Aminosäure	gefunden	berechnet
Asp	1,01	1,00
Ser	1,00	1,00
Glu	1,99	2,00

Gly	1,00	1,00
Ala	0,93	1,00
Val	1,03	1,00
Leu	4,20	4,00
Orn	1,99	2,00

Synthese der Sequenz 9-14 am Polyäthylenglykolträger

Boc-L-Glu(OtBu)-Leu-Ser(Bzl)-Orn(Z)-Leu-Orn(Z)-N_2H_3

1) Veresterung des Boc-Orn(Z)-OH mit dem PEG

25 g gut getrocknetes PEG (Molekulargewicht 10 000, entspr. 5 mMol freie OH-Gruppen) wurden in 180 ml CH_2Cl_2 gelöst und mit 9,3 g (25,41 mMol) Boc-L-Orn(Z)-OH und 5,24 g (25,41 mMol) DCCI versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 8 Tage bei Zimmertemperatur gerührt, dann der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und mit absolutem Äther das veresterte PEG ausgefällt und aus Äthanol/Äther umgefällt. Eine anschließend durchgeführte Aminosäureanalyse ergab eine Beladung von 90,5 %.

2) Kupplung der Aminosäurederivate

Die Arbeitsoperationen entsprachen denen, die bereits bei der Synthese der Sequenz 15-27 beschrieben wurden. Gekuppelt wurde mit voraktivierten Aminosäuren (34), die Umsätze der Kupplungen wurden durch Titration bestimmt. Die Boc-Schutzgruppen wurden bei Zimmertemperatur in einer 10%-igen Lösung des Polymers in 1,2 N HCl in Eisessig abgespalten. Vor jeder Kupplung, bzw. vor der Abspaltung der Schutzgruppe wurde so lange aus Methylenchlorid/Äther oder aus Äthanol/Äther umgefällt, bis die Produkte dünnschichtchromatographisch rein waren. Verwendet wurden nur absolute Lösungsmittel.

a) Kupplung von Boc-L-Leu-OH an H-L-Orn(Z)-PEG

24 g (4,32 mMol) H-L-Orn(Z)-PEG, gelöst in 200 ml CH_2Cl_2
10 g (43,2 mMol) Boc-L-Leu-OH (wasserfrei)
4,45 g (21,6 mMol) DCCI
Voraktivierung bei 0° C: 1 Stunde
Kupplungsdauer: 2 Stunden
Umsatzkontrolle: 79 % Kupplungsausbeute
Nachkupplung:
24 g (4,32 mMol) H-L-Orn(Z)-PEG, gelöst in 150 ml CH_2Cl_2
5 g (21,5 mMol) Boc-L-Leu-OH (wasserfrei)
2,06 g (10 mMol) DCCI
Voraktivierung bei 0° C: 30 Minuten
Kupplungsdauer: 5 Stunden
Umsatzkontrolle: Vollständige Kupplung
Titration nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe: 90 % freie Aminofunktionen, d.h.vollständige Abspaltung der Schutzgruppen.

b) Kupplung von Boc-L-Orn(Z)-OH an H-L-Leu-Orn(Z)-PEG

24 g (4,32 mMol) H-L-Leu-Orn(Z)-PEG, gelöst in 180 ml CH_2Cl_2
15,9 g (43,2 mMol) Boc-L-Orn(Z)-OH
4,46 g (21,6 mMol) DCCI
Voraktivierung bei 0° C: 30 Minuten
Kupplungsdauer: 20 Stunden
Umsatzkontrolle: 95 % Kupplungsausbeute
Nachkupplung:
24 g (0,22 mMol) H-L-Leu-Orn(Z)-PEG, gelöst in 150 ml CH_2Cl_2
3,22 g (8,8 mMol) Boc-L-Orn(Z)-OH
0,91 g (4,4 mMol) DCCI
Voraktivierung bei 0° C: 30 Minuten
Kupplungsdauer: 24 Stunden
Umsatzkontrolle: Vollständige Umsetzung
Titration nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe: 90 % freie Aminofunktionen,d.h. vollständige Abspaltung.

Kupplungsdauer: 8 Stunden
Umsatzkontrolle: Vollständige Umsetzung
Titration nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe: 90 % freie Aminofunktionen, d.h. vollständige Abspaltung

e) Kupplung von Boc-L-Glu(OtBu)-OH an H-L-Leu-Ser(Bzl)-Orn(Z)-Leu-Orn(Z)-PEG

20 g (5,5 mMol) H-L-Leu-Ser(Bzl)-Orn(Z)-Leu-Orn(Z)-PEG,
gelöst in 180 ml CH_2Cl_2,
5,91 g (19,5 mMol) Boc-L-Glu(OtBu)-OH
4,02 g (19,5 mMol) DCCI
Voraktivierung: keine
Kupplungsdauer: 4 Stunden
Kupplungsausbeute: 70 %
Nachkupplung:
7 g (1,9 mMol) H-L-Leu-Ser(Bzl)-Orn(Z)-Leu-Orn(Z)-PEG,
gelöst in 170 ml CH_2Cl_2
1,9 g (6,3 mMol) Boc-L-Glu(OtBu)-OH
1,3 g (6,3 mMol) DCCI
Voraktivierung: keine
Kupplungsdauer: 4 Stunden
Umsatzkontrolle: Kupplungsausbeute 99 %

Nach dem Anbau der letzten Aminosäure wurde ein Teil des beladenen PEG vollständig hydrolysiert. Das Hydrolysat zeigte folgende Aminosäureanalyse:

Aminosäure	gefunden	berechnet
Ser	1,00	1,00
Glu	1,00	1,00
Leu	1,95	2,00
Orn	2,20	2,00

3) Abspaltung des Peptids vom PEG durch Hydrazinolyse

5 g beladenes PEG wurden in 50 ml absolutem Äthanol und 50 ml absolutem Methanol gelöst und die Lösung mit

0,5 ml Hydrazinhydrat (100 %ig) versetzt. Dann wurde die Reaktionsmischung 4 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, anschließend das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in warmem Äthanol aufgenommen und das PEG in der Kälte wieder ausgefällt. Das Peptid blieb dabei in Lösung. Das PEG wurde abfiltriert und aus dem Filtrat das Lösungsmittel abgezogen, nachdem mit verdünnter HCl neutralisiert worden war. Der Rückstand wurde in 300 ml Wasser suspendiert und einige Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Dann wurde das Peptid, das in Wasser unlöslich ist, abzentrifugiert. Ausbeute 105 mg.
Die Ausbeute vom gesamten Trägermaterial betrug 780 mg. Das Hexapeptidhydrazid war dünnschichtchromatographisch einheitlich.

R_f-Werte: 0,79 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)
0,95 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)
0,82 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)

Die Elektrophorese des geschützten Peptids bei 900 V und 5 mA in 0,1%-iger Lösung von Eisessig und Ameisensäure 1:1 ergab nach zwei Stunden keine Wanderung.

Aminosäureanalyse:

Aminosäure	gefunden	berechnet
Ser	1,00	1,00
Glu	0,99	1,00
Leu	2,00	2,00
Orn	2,01	2,00

Elementaranalyse ber.: 61,16 % C, 7,62 % H, 11,50 % N
gef.: 61,04 % C, 7,59 % H, 11,60 % N

Die gaschromatographische Kontrolle auf Racemisierung ergab, daß die Synthese racemisierungsfrei (< 1%) verlaufen war.

Synthese der Sequenz 3-8 am Polyäthylenglykolträger

Boc-L-Asp(OtBu)-Gly-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-N_2H_3

1) Veresterung des PEG mit Boc-L-Ser(Bzl)-OH

15 g PEG (Molekulargewicht 10 000, entspr. 3 mMol OH-Gruppen) wurden in etwas CH_2Cl_2 gelöst und mit Äther wieder ausgefällt, um ein möglichst feinkristallines Produkt zu erhalten. Dann wurde es im Hochvakuum über P_2O_5 bei 35° C gut getrocknet. Anschließend wurde das trockene PEG in 130 ml absolutem CH_2Cl_2 gelöst und zu dieser Lösung 7,1 g (24 mMol) Boc-L-Ser(Bzl)-OH und 4,95 g (24 mMol) DCCI gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 7 Tage bei Zimmertemperatur gerührt, anschließend der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Das veresterte PEG wurde mit Äther ausgefällt und aus Äthanol/Äther umkristallisiert. Die anschließend durchgeführte Aminosäureanalyse ergab eine Beladung von 81 % .

2) Kupplung der Aminosäurederivate

Es wurden die gleichen Arbeitsmethoden wie bei den beiden vorangegangenen Synthesen verwendet.

a) Kupplung von Boc-L-Thr(Bzl)-OH an H-L-Ser(Bzl)-PEG

15 g (2,43 mMol) H-L-Ser(Bzl)-PEG, gelöst in 130 ml CH_2Cl_2
4,51 g (14,58 mMol) Boc-L-Thr(Bzl)-OH
1,50 g (7,29 mMol) DCCI
Voraktivierung bei 0° C: 30 Minuten
Kupplungsdauer: 1 Stunde
Umsatzkontrolle: vollständige Kupplung
Aminosäureanalyse:

Aminosäure	gefunden	berechnet
Ser	1,00	1,00
Thr	0,85	1,00

b) Kupplung von Boc-L-Phe-OH an H-L-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-PEG

15 g (2,43 mMol) H-L-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-PEG, gelöst in 130 ml CH_2Cl_2
6,45 g (24,3 mMol) Boc-L-Phe-OH
2,51 g (12,15 mMol) DCCI
Voraktivierung bei 0° C: 30 Minuten
Kupplungsdauer: 3 Stunden
Umsatzkontrolle: vollständige Kupplung

c) Kupplung von Boc-L-Thr(Bzl)-OH an H-L-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-PEG

15 g (2,43 mMol) H-L-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-PEG, gelöst in 130 ml CH_2Cl_2
4,51 g (14,58 mMol) Boc-L-Thr(Bzl)-OH
1,5 g (7,29 mMol) DCCI
Voraktivierung bei 0° C: 1 Stunde
Kupplungsdauer: 3 Stunden
Umsatzkontrolle: 30 % Kupplungsausbeute
Nachkupplung:
15 g (1,7 mMol) H-L-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-PEG, gelöst in 130 ml CH_2Cl_2
4,51 g (14,58 mMol) Boc-L-Thr(Bzl)-OH
1,5 g (7,29 mMol) DCCI
Voraktivierung bei 0° C:30 Minuten
Kupplungsdauer: 5 Stunden
Umsatzkontrolle: 81 % Kupplungsausbeute
Nachkupplung:
15 g (0,48 mMol) H-L-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-PEG, gelöst in 130 ml CH_2Cl_2
4,51 g (14,58 mMol) Boc-L-Thr(Bzl)-OH
1,5 g (7,29 mMol) DCCI
Voraktivierung bei 0° C: 1 Stunde
Kupplungsdauer: 3 Stunden
Umsatzkontrolle: vollständige Kupplung

Titration nach der Boc-Schutzgruppen-Abspaltung: 79,5 % freie Aminogruppen, d.h. vollständige Abspaltung.

Bei einer Vorsynthese machte die Abspaltung der α-Aminoschutzgruppe an dieser Stelle der Kette sehr große Schwierigkeiten. Die N^{α}-Boc-Schutzgruppe ließ sich erst nach mehrmaliger Behandlung mit HCl/Eisessig und Trifluoressigsäure/Methylenchlorid vollständig abspalten.

d) Kupplung von Boc-Gly-OH an H-L-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-PEG

12 g (ca. 1,9 mMol) H-L-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-PEG, gelöst in 120 ml CH_2Cl_2
6,73 g (38,4 mMol) Boc-Gly-OH
3,96 g (19,2 mMol) DCCI
Voraktivierung bei 0° C: 20 Minuten
Kupplungszeit: 3 Stunden
Umsatzkontrolle: 84 % Kupplungsausbeute
Nachkupplung:
12 g (ca. 0,3 mMol) H-L-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-PEG, gelöst in 120 ml CH_2Cl_2
3,37 g (19,2 mMol) Boc-Gly-OH
1,98 g (9,6 mMol) DCCI
Voraktivierung bei 0° C: 30 Minuten
Kupplungszeit: 15 Stunden
Umsatzkontrolle: vollständige Kupplung
Titration nach der Boc-Schutzgruppenabspaltung: 80 % freie Aminogruppen, d.h. vollständige Abspaltung.

e) Kupplung von Boc-L-Asp(OtBu)-OH an H-Gly-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-PEG

9 g (ca. 1,24 mMol, bei Molekulargewicht 11 706) H-Gly-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-PEG, gelöst in 80 ml CH_2Cl_2
1,43 g (4,96 mMol) Boc-L-Asp(OtBu)-OH

1,02 g (4,96 mMol) DCCI
Voraktivierung: keine
Kupplungszeit: 4 Stunden
Umsatzkontrolle: 59 % Kupplungsausbeute
Nachkupplung:
9 g (ca. 0,5 mMol) H-Gly-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-PEG, gelöst in 80 ml CH_2Cl_2
1,48 g (5,1 mMol) Boc-L-Asp(OtBu)-OH
1,05 g (5,1 mMol) DCCI
Voraktivierung: Keine
Kupplungszeit: 20 Stunden
Umsatzkontrolle: vollständige Kupplung
Aminosäureanalyse:

Aminosäure	gefunden	berechnet
Asp	1,03	1,00
Thr	1,68	2,00
Ser	1,01	1,00
Gly	1,00	1,00
Phe	0,96	1,00

3) Abspaltung des Peptids vom Träger

5 g (ca. 0,7 mMol) trägergebundenes Hexapeptid wurden in 50 ml Äthanol gelöst und mit 5 g (100 mMol) Hydrazinhydrat versetzt und 2 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen, mehrmals in Äthanol aufgenommen und wieder abgezogen und dann in erwärmtem Äthanol von 35° C aufgenommen und in der Kälte das PEG ausgefällt. Das abgespaltene Peptid blieb in Lösung. Das PEG wurde abfiltriert und das Filtrat zur Trockene eingedampft. Dann wurde der Rückstand in 200 ml Wasser suspendiert und mehrere Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Das Peptid war nicht wasserlöslich und konnte deshalb abzentrifugiert werden. Die Aminosäureanalyse nach Abspaltung vom Träger ergab folgende Werte:

Aminosäure	gefunden	berechnet
Asp	0,67	1,00
Thr	2,01	2,00
Ser	1,00	1,00
Gly	1,00	1,00
Phe	1,03	1,00

Diese Aminosäureanalyse zeigte, daß die Peptidbindung zwischen Asparaginsäure und Glycin bei der Hydrazinolyse gespalten worden war, denn vor der Abspaltung vom Polyäthylenglykol hatte die durchgeführte Aminosäureanalyse für Asparaginsäure die richtigen Werte geliefert. Nicht gekuppelte Asparaginsäure war nicht mehr enthalten gewesen, da das PEG-Peptid dünnschichtchromatographisch einheitlich gewesen war.

Durch Chromatographie auf einer Säule (100 cm lang, Innendurchmesser 2,5 cm) mit Sephadex LH 20 konnte das Peptid gereinigt werden und das Pentapeptid vom Hexapeptid abgetrennt werden. Als Laufmittel wurde Methanol/Methylenchlorid im Verhältnis 3:2 (V:V) mit einer Elutionsrate von 35 ml/h verwendet. In einem Durchgang konnten jeweils 60 bis 80 mg Peptidgemisch gereinigt werden. Die Chromatographie wurde mit Hilfe eines UV-Monitors bei 254 nm kontrolliert. Man erhielt das auf Seite 41 (Abb. 9) abgebildete Elutionsdiagramm, das zwei deutlich getrennte Peaks aufwies.

Durch eine Aminosäureanalyse der beiden Fraktionen konnte gezeigt werden, daß der erste Peak dem Hexapeptid mit Asparaginsäure, der zweite Peak dem Pentapeptid ohne Asparaginsäure entsprach.

Die Aminosäureanalysen der beiden Fraktionen lieferten folgende Ergebnisse:

Aminosäure	1.Peak	2.Peak	berechnet
Asp	1,10	0,24	1,00
Thr	1,85	2,04	2,00
Ser	1,00	1,00	1,00
Gly	1,00	1,00	1,00
Phe	1,00	1,05	1,00

Zweite Hydrazinolyse des Peptids vom Träger

Da bei der ersten Abspaltung eine Peptidbindung durch Hydrazin gespalten worden war, wurde bei der zweiten Abspaltung nur ein 15-facher Überschuß an Hydrazin verwendet.

5 g (0,7 mMol) trägergebundenes Hexapeptid wurden in 40 ml Methanol gelöst und mit 0,5 ml Hydrazinhydrat versetzt. Die Reaktionszeit betrug 4 Stunden. Die Aufarbeitung wurde wie bei der ersten Abspaltung durchgeführt. Eine säulenchromatographische Reinigung erübrigte sich jedoch, da eine Probe mit dem Peak 1 der ersten Abspaltung identisch war.
Ausbeute 280 mg (ca. 50 %)
Die Aminosäureanalyse des abgespaltenen Peptids hatte folgendes Ergebnis:

Aminosäure	gefunden	berechnet
Asp	0,99	1,00
Thr	1,99	2,00
Ser	1,00	1,00
Gly	1,00	1,00
Phe	1,04	1,00

Das abgespaltene Produkt war dünnschichtchromatographisch einheitlich.
R_f-Werte: 0,77 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)
0,83 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,84 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)

Elementaranalyse ber.: 63,98 % C, 7,09 % H, 10,66 % N
gef.: 64,15 % C, 7,17 % H, 10,53 % N

Synthese des Dipeptids der Secretinsequenz 1-2

Bis-Adamantyloxycarbonyl-L-histidyl-O-benzyl-L-serin-äthylester (Adoc-L-His(Adoc)-Ser(Bzl)-OEt)

2 g (7,8 mMol) H-L-Ser(Bzl)-OEt·HCl wurden in 30 ml Essigester aufgeschlämmt, auf 0° C gekühlt und mit 0,8 g (7,8 mMol) Triäthylamin neutralisiert. Das ausgefallene Triäthylammoniumchlorid wurde abgesaugt. Vom Filtrat wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und die freie Base in 30 ml CH_2Cl_2 aufgenommen. Zu dieser Lösung wurden 4 g (7,8 mMol) Adoc-L-His(Adoc)-OH gegeben, auf 0° C gekühlt und die Lösung mit 1,61 g (7,8 mMol) DCCI versetzt, das in etwas Methylenchlorid gelöst war. Die Reaktionsmischung wurde 4 Stunden bei 0° C und 1 Stunde bei Zimmertemperatur gerührt. Der Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert, das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand in Essigester aufgenommen. Dann wurde je dreimal mit 5%-iger $NaHCO_3$-Lösung, mit Wasser und mit 3%-iger HCl gewaschen, anschließend wurde mit Wasser neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Peptid mit Petroläther ausgefällt. Es fiel nur ein kleiner Teil aus. Der Rest konnte nur durch Abziehen des Lösungsmittels kristallin erhalten werden.

Ausbeute 3,3 g (59 %)
Smp.: 134-135° C
R_f-Werte: 0,80 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)
0,89 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,87 (EtOH/H_2O/Benzol/HAc 40:20:10:5)
0,83 (n-Butanol/Pyridin/HAc/H_2O 30:20:6:24)
Aminosäureanalyse: His 0,97 (1,00), Ser 1,00 (1,00)
Elementaranalyse ber.: 67,02 % C, 7,31 % H, 7,82 % N
gef.: 66,82 % C, 7,12 % H, 7,99 % N

Adoc-L-His(Adoc)-Ser(Bzl)-OMe

5,53 g (22,5 mMol) O-Benzyl-L-Serinmethylesterhydrochlorid wurden in 60 ml Essigester aufgeschlämmt, auf 0° C gekühlt und mit 2,28 g (22,5 mMol) Triäthylamin neutralisiert. Dann wurde das ausgefallene Triäthylammoniumchlorid abfiltriert, der Essigester aus dem Filtrat im Vakuum abgezogen und der Rückstand in 50 ml absolutem CH_2Cl_2 aufgenommen. Zu dieser Lösung wurden 11,5 g (22,5 mMol) Adoc-L-His(Adoc)-OH gegeben und auf 0° C gekühlt. Nach Zugabe von 4,64 g (22,5 mMol) DCCI wurde die Reaktionsmischung 4 Stunden bei 0° C gerührt. Dann wurde auf Zimmertemperatur gebracht, der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und der Rückstand in Essigester aufgenommen. Die Lösung wurde je dreimal mit 5%-iger $NaHCO_3$-Lösung, mit 3%-iger HCl und anschließend noch mit Wasser neutral gewaschen. Dann wurde über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen. Dabei kristallisierte das Produkt aus. Eine Umkristallisation aus Essigester/Petroläther ist mit einem großen Verlust an Substanz verbunden und wurde deshalb nicht durchgeführt, da der Dipeptidester auch amorph gute Analysen ergab und chromatographisch einheitlich war.

Ausbeute 11 g (70 %)

Smp.: 73-75° C

R_f-Werte: 0,76 (MeOH/$CHCl_3$ 1:1)
0,77 (n-Butanol/Pyridin/HAc/H_2O 30:20:6:24)
0,80 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)

Aminosäureanalyse:

Aminosäure	gefunden	berechnet
His	1,01	1,00
Ser	0,98	1,00

Elementaranalyse ber.: 66,65 % C, 7,17 % H, 7,97 % N
gef.: 66,66 % C, 7,26 % H, 7,96 % N

Adoc-L-His(Adoc)-Ser(Bzl)-N_2H_3

2 g (2,85 mMol) Adoc-L-His(Adoc)-Ser(Bzl)-OMe wurden in 20 ml absolutem Methanol gelöst und mit 2,13 g (42,8 mMol) Hydrazinhydrat versetzt. Die Mischung wurde bei Zimmertemperatur 10 Stunden gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt. Dann wurde das Methanol teilweise abgezogen, das Produkt mit Wasser ausgefällt und mit verdünnter HCl neutralisiert. Das Produkt war dünnschichtchromatographisch nicht einheitlich. Es wurde über eine 1 m lange Sephadex LH 20 - Säule mit Methanol als Laufmittel chromatographiert. (Fließgeschwindigkeit 35 ml/h) Anschließend enthielt das Produkt immer noch Spuren von Hydrazin, die durch mehrmaliges Umfällen aus Methanol/Wasser entfernt werden konnten.

Ausbeute: 1,2 g (60 %)

R_f-Werte: 0,84 (n-Butanol/HAc/H_2O 2:1:1)
0,80 (n-Butanol/HAc/H_2O 3:1:1)
0,76 ($CHCl_3$/MeOH 1:1)
0,87 ($CHCl_3$/MeOH/HAc/H_2O 60:45:6:14)

Aminosäureanalyse:

Aminosäure	gefunden	berechnet
His	1,01	1,00
Ser	0,99	1,00

Elementaranalyse ber.: 64,94 % C, 7,16 % H, 11,96 % N
gef.: 64,82 % C, 7,11 % H, 12,01 % N

IV Zusammenfassung

Es wurde ein Konzept für eine Synthese des Secretins erarbeitet, bei dem mit der Flüssigphasenmethode dargestellte Teilsequenzen die Schlüsselprodukte eines ornithinanalogen Secretins sind, das später durch Guanidierung in Secretin überführbar wäre.

Alle für eine Totalsynthese des Secretins nach der Azidmethode notwendigen, kupplungsfähigen Fragmente konnten an dem löslich machenden Träger Polyäthylenglykol synthetisiert werden. Dabei hat es sich herausgestellt, daß mit der Flüssigphasenmethode im Gegensatz zu der ebenfalls für dieses Problem untersuchten Festphasenmethode größere, einheitliche Fragmente synthetisiert werden können. Allerdings erfordert auch die Festphasenmethode eine sorgfältige Kontrolle jedes Reaktionsschritts. Zur genauen Bestimmung der Umsatzraten sowohl bei der Kupplung als auch bei der Schutzgruppenabspaltung haben sich Titrationsmethoden gut bewährt.

Ferner konnte an Hand von klassisch dargestellten Modellpeptiden gezeigt werden, daß eine Überführung von Ornithin in Arginin in Peptidsequenzen durch Guanidierung mit 3,5-Dimethylpyrazolnitrat möglich ist und daß diese Reaktion vollständig verläuft. Dadurch ist es möglich, das bei Peptidsynthesen schwierig zu handhabende Arginin durch Ornithin zu ersetzen und dieses Ornithin nachträglich in Arginin überzuführen.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Liquid-Phase-Methode in der Variante der Kristallisationsmethode zur Darstellung der Secretinsequenzen infolge ihrer Variationsbreite und ihrer Kontrollierbarkeit die bisher entwickelten Trägersynthesen übertrifft. In manchen Punkten, wie Löslichkeitsfragen und Geschwindigkeit übertrifft sie sogar klassische Synthesen.

V) Literaturverzeichnis

1) W.M.Bayliss und E.H.Starling
Proc. Roy. Soc. 69, 352 (1902)
2) A.Labhart
Klinik der inneren Sekretion, 2.Aufl. S.1011
3) M.Bodanszky und C.H.Li
Hormonal Proteins and Peptides, Academic Press Vol. 2
S. 29 (1973)
4) E.Jorpes und V.Mutt
Acta Chem. Scand. 15, 1790-1791 (1961)
5) V.Mutt, E.Jorpes und S.Magnussen
Eur.J.Biochem. 15, 513-519 (1970)
6) V.Mutt
Recent Progr. Horm. Res. 23, 496 (1967)
7) M.Bodanszky und C.H.Li
Hormonal Proteins and Peptides, Academic Press,Vol.2
S. 34 (1973)
8) M.J.Smithers
Peptides 1969, 44 - 51, North Holl.Publ.Comp. (1971)
9) M.Bodanszky et al.
Chem. and Ind. (London) 1966, 1757-1758
10) M.Bodanszky und N.J.Williams
J.Am.Chem.Soc. 89, 685-689 (1967)
11) M.Bodanszky, M.A.Ondetti, S.D.Levine und N.J.Williams
J.Am.Chem.Soc. 89, 6753-6757 (1967)
12) M.A.Ondetti, V.L.Narayan, M.v.Saltza, J.T.Sheehan,
E.F.Sabo und M.Bodanszky
J.Am.Chem.Soc. 90, 4711-4716 (1967)
13) E.Wünsch, G.Wendlberger und A.Högel
Chem.Ber. 104, 2430-2444 (1971)
14) E.Wünsch, G.Wendlberger und P.Thamm
Chem. Ber. 104, 2445-2453 (1971)
15) E.Wünsch und P.Thamm
Chem. Ber. 104, 2454-2457 (1971)
16) E.Wünsch,G.Wendlberger und R.Spangenberg
Chem. Ber. 104, 3854-3958 (1971)

17) E. Wünsch und G. Wendlberger
Chem. Ber. 105, 2508-2514 (1972)
18) E. Wünsch, E. Jäger, M. Deffner, R. Scharf und P. Lehnert
Chem. Ber. 105, 2515-2522 (1972)
19) E. Bayer, E. Breitmaier, G. Jung und W. Parr
Hoppe Seyler's Z.Physiol. Chem. 352, 759-760 (1971)
20) G. Jäger, W. König, H.Wissmann und R. Geiger
Chem. Ber. 107, 215-231 (1974)
21) W. Göhring
Diplomarbeit (1972)
22) A.v.Zon, H.C. Beyermann
Helv. Chim. Acta 56, 1729-1740 (1973)
23) B. Hemmasi und E. Bayer
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 481-489 (1974)
24) Th. Curtius
Chem. Ber. 35, 3226-3228 (1902)
25) D. S. Kemp
Peptides 1971, S. 1-9 , North Holl. Publ. Comp.
26) M. Bergmann und L. Zervas
J. Biol. Chem. 113, 341 (1936)
27) M.A.Nymann und R.M.Herbst
J. Org. Chem. 15, 108-118 (1950)
28) J.W. Hinman, E.L. Caron und H.N. Christensen
J. Am. Chem. Soc. 72, 1620-1626 (1950)
29) A. Honzl und W. Rudinger
Coll. Czech. Chem. Comm. 26, 2333 (1961)
30) Th. Wieland und H. Bernhard
Liebigs Ann. Chem. 572, 190-194 (1951)
31) R.A. Boissonas
Helv. Chim. Acta 34, 874-879 (1951)
32) F. Weygand, P. Huber und K. Weiss
Z. Naturforsch. 22 b, 1084-1085 (1967)
33) F. Flor, Ch. Birr und Th. Wieland
Liebigs Ann. Chem. 1973, 1601-1605
34) H. Hagenmaier und H. Frank
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1973-1976 (1972)

35) H. Leuchs
Chem. Ber. 39, 857-861 (1906)
36) H. Leuchs und W. Geiger
Chem. Ber. 41, 1721-1726 (1908)
37) F.Fuchs
Chem. Ber. 55, 2943 (1922)
38) R. Hirschmann et al.
J. Am. Chem. Soc. 93, 2746-2754 (1971)
39) P. Pfaender et al.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 267-285 (1973)
40) M. Bodanszky, M. Szelke, E. Tömörkény und E. Weisz
Chem. and Ind. (London) 1517 (1955)
41) J. Pless und R.A. Boissonas
Helv. Chim. Acta 46, 1609-1625 (1963)
42) J. Kovacs, M.C.Caprini, C.A.Dupraz und G.N.Schmit
J. Org. Chem. 32, 3696-3698 (1967)
43) G.W. Anderson, J.F. Zimmermann und F.M. Callahan
J. Am. Chem. Soc. 85, 3039 (1963)
44) J. C. Sheehan und G. P. Hess
J. Am. Chem. Soc. 77, 1067-1068 (1955)
45) J. C. Sheehan, M. Goodman und G. P. Hess
J. Am. Chem. Soc. 78, 1367-1369 (1956)
46) J. Rebek und D. Feitler
J. Am. Chem. Soc. 95, 4052 (1973)
47) J. Rebek
J. Am. Chem. Soc. 96, 1606-1607 (1974)
48) F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch
Z. Naturforsch. 21 b,426-428 (1966)
49) W. König und R. Geiger
Chem. Ber. 103, 788-798 (1970)
50) G. A. Fletcher und J. H. Jones
Int. J. Peptide Protein Res. 4, 347-371 (1972)
51) M. Bergmann und L. Zervas
Chem. Ber. 65, 1192-1201 (1932)
52) F. C. Mc Kay und N. F. Albertson
J. Am. Chem. Soc. 79, 4686-4690 (1957)

53) W.L. Haas, E.V. Krumkalns und K. Gerzon
J. Am. Chem. Soc. 88, 1988-1992 (1966)
54) P. Sieber und B. Iselin
Helv. Chim. Acta 51, 614-622 (1968)
55) V. du Vigneaud, L.F. Audrieth und H.S. Loring
J. Am. Chem. Soc. 52, 4500-4504 (1930)
56) K. Okawa
Bull. Chem. Soc. Jap. 30, 110 (1957)
57) E. Wünsch, G. Wendlberger und A. Högel
Chem. Ber. 104, 2430-2444 (1971)
58) W. Kossel
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 72, 486-489 (1911)
59) L. Zervas, M. Winitz und J.P.Greenstein
J. Org. Chem. 22, 1515-1521 (1957)
60) E. Wünsch
Angew. Chem. 83, 773-812 (1971)
61) R. B. Merrifield
J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154 (1963)
62) E.Bayer, H.Eckstein, K.Hägele, W.A.König, W.Brüning,
H.Hagenmaier und W. Parr
J. Am. Chem. Soc. 92, 1735-1737 (1970)
63) W. Brenner
Peptides 1966 S. 1-7, North Holl. Publ. Comp. 1967
64) H. Frank
Dissertation Tübingen 1973, S. 5-8
65) W. Parr und K. Grohmann
Tetrahedron Letters 28, 1971, 2633-2636
66) E. Bayer, G. Jung, I, Halasz und J. Sebestian
Tetrahedron Letters 51, 1970, 4503-4505
67) M.M. Shemyakin et al.
Tetrahedron Letters 1965, 2323-2327
68) M. Mutter, H. Hagenmaier und E. Bayer
Angew. Chem. 83, 883-883 (1971)
69) E. Bayer und M. Mutter
Nature 237, 512-513 (1972)
70) M. Mutter und E. Bayer
Angew. Chem. 86, 101-102 (1974)

71) G. Spach, L. Reibel, N.H. Loucheux und J. Parrod
J. of Polymer Science, Part C, Nr. 16, 4705-4712 (1969)
72) M. Mutter
Dissertation Tübingen 1973 S. 62-63
73) M. Schattenberg
Unveröffentlichte Mitteilung
74) S. Moore, D.H. Spackman und W.H. Stein
Anal. Chem. 30, 1185-1190 (1958)
75) P. Rivaille, Lê Du und G. Milhaud
C.R.Acad.Sci.Ser. C 277,(1973) 9, 343-346
76) M. Bodanszky, M.A. Ondetti, C.A. Birkhimer und P.L.Thomas
J. Am. Chem. Soc. 86, 4452-4459 (1962)
77) H. N. Christensen
J. Biol. Chem. 160, 75-82 (1945)
78) J.S. Fruton
Adv. Prot. Chem. 5, 62-64 (1949)
79) W. L. Hughes jr. H.A. Saroff und A.L. Carney
J. Am. Chem. Soc. 71, 2476-2480 (1949)
80) E. Schütte et al.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 279, 52-59 (1943)
81) A.F.S.A. Habeeb
Can. J. Biochem. Physiol. 38, 493-501 (1960)
82) R.L.M. Synge
Biochem. J. 42, 99 (1943)
83) M. Bodanszky und V. du Vigneaud
J. Am. Chem. Soc. 81, 5688-5691 (1959)
84) T.D. Gish, P. Katsoyannis, G.P.Hess und R.J. Stedman
J. Am. Chem. Soc. 78, 5954 (1956)
85) C. Ressler
J. Am. Chem. Soc. 78, 5956-5957 (1956)
86) D.V. Kashelikar und C. Ressler
J. Am. Chem. Soc. 86, 2467-2473 (1964)
87) E. Schaich, A.M. Fretzdorff und F. Schneider
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 897-902 (1973)
88) E. Schnabel, H.Herzog, P. Hoffmann, E.Klauke u. I. Ugi
Liebigs Ann. Chem. 716, 175-185 (1968)

89) E. Schnabel, J. Stoltefuß, H.A. Offe u. E.Klauke
Liebigs Ann. Chem. 743, 57-68 (1971)
90) L.A. Carpino
J. Am. Chem. Soc. 79, 4427-4431 (1957)
91) J. Greenstein und A. Winitz
Chemistry of the Amino-Acids,Wiley and Sons 1961,S.890
92) E. Schnabel
Liebigs Ann. Chem. 702, 188-196 (1967)
93) H.Zahn, W. Danho und B. Gutte
Z. Naturforsch. 21 b, 763-773 (1966)
94) E. Sandrin und R. A. Boissonas
Helv. Chim. Acta 46, 1637-1669 (1963)
95) H. Eckstein
Dissertation Tübingen 1970, S. 39-40
96) B.C. Barrass und D.T. Elmore
J. Chem. Soc. 1957, 3134-3139
97) W. Grassmann, E. Wünsch, P. Deufel und A. Zwick
Chem. Ber. 91, 538-541 (1958)
98) J. Greenstein und A. Winitz
Chemistry of the Amino-Acids, Wiley and Sons 1961,S.2233
99) S.M. Birnbaum et al.
J. Biol. Chem. 194, 455 (1952)
100) Hoppe,Seyler,Thierfelder
Handbuch der Physiologischen und Pathologischen chemischen Analyse Bd. III S. 1670
Springer Verlag 1955
101) H. Eckstein
Dissertation Tübingen 1970, S. 55
102) T. Mizoguchi, G. Levin, D. Woolley und J. Stewart
J. Org. Chem. 33, 903 (1968)
103) E. Wünsch und A. Zwick
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 328, 235-240 (1962)
104) W. Voelter, K.Zech, W.Grimminger, E.Breitmaier und G.Jung
Chem. Ber. 105, 3650-3657 (1972)
105) W.J. Le Quesne und G.T.Young
J. Chem. Soc. 1952, 24-28

106) K. Zech
Dissertation Tübingen 1973 S. 172
107) R. Schwyzer, B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker
W. Rittel und H. Zuber
Helv. Chim. Acta 46, 1975-1996 (1963)
108) S. Goldschmidt und C. Jutz
Chem. Ber. 86, 1116-1121 (1953)
109) J. Le Quesne und G.T. Young
J. Chem. Soc. 1950, 1954-1959
110) E. Klieger, E. Schröder und H. Gibian
Liebigs Ann. Chem. 640,157-167 (1961)
111) E. Taschner, A. Chimiak, J.F. Biernat, C. Wasielewski und T. Sokolowska
Liebigs Ann. Chem. 663, 188-193 (1963)
112) E. Schröder und E. Klieger
Liebigs Ann. Chem. 673, 196-207 (1964)
113) J. Greenstein und A. Winitz
Chemistry of the Amino-Acids, Wiley and Sons 1961
S. 930
114) K. Okawa
Bull. Chem. Soc. Jap. 30, 976 (1957)

Lebenslauf

Am 22. Mai 1945 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Erwin Göhring und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Klett, in Zillhausen Krs. Balingen geboren.

Von 1951 bis 1956 besuchte ich die Volksschule in Zillhausen und vom Frühjahr 1956 an das Gymnasium Balingen, an dem ich im Frühjahr 1965 das Abitur ablegte. Von April 1965 bis September 1966 leistete ich meinen Grundwehrdienst ab.

Im Wintersemester 1966/67 begann ich das Chemiestudium an der Universität Tübingen und bestand 1969 das Vordiplomexamen und im Juli 1971 das Hauptdiplomexamen. Unter der Leitung von Herrn Professor Dr. G. Jung führte ich von September 1971 bis März 1972 die experimentelle Diplomarbeit und von April 1972 bis Juli 1974 die experimentelle Doktorarbeit durch.

Meine akademische Ausbildung verdanke ich Frau Professor Dr. S. Kemmler-Sack und den Herren Professoren und Dozenten D.Babel, W.Baumann, E.Bayer, W.Braun, W. Bues, G.Häfelinger, M.Hanack, G.Jung, W.König, G.Kortüm, W.Kraus, H.Krüger, H.Mauser, H.Meier, E.Müller, D.Oelkrug, H.Rau, A.Rieker, W.Rüdorff, W.Schweizer, H.Stegmann, E.Stumpp, W.Voelter.

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
7000 Stuttgart 1, Forststr. 58
Telefon (0711) 61 06 41 / 42

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
7000 Stuttgart 1, Forststr. 58
Telefon (0711) 61 06 41 / 42